

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Effets des facteurs de croissance sur la maturation ovocytaire et la fécondation in vitro chez l'ovine

Wallemme, Laurent

Award date:
2000

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**EFFETS DES FACTEURS DE CROISSANCE SUR LA MATURATION
OVOCYTAIRE ET LA FECONDATION IN VITRO CHEZ L'OVIN**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Laurent WALLEMME

Août 2000

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Effets des facteurs de croissance sur la maturation ovocytaire et la fécondation in vitro chez l'ovin.

WALLEMME Laurent

Résumé

Dans la culture de cellules eucaryotes, il est courant d'utiliser diverses solutions non définies d'origine animale comme, par exemple, le sérum de veau fœtal pour la culture de différentes cellules somatiques, le fluide folliculaire pour la culture d'ovocytes, ou encore le sérum de brebis en chaleur ou de vache superovulée. Dans ces solutions, les facteurs de croissance sont probablement les substances les plus actives et c'est pourquoi ils font l'objet de diverses études afin de déterminer avec précision leurs rôles exacts.

Les effets de l'IGF-I, du bFGF et du TNF α sur la maturation ovocytaire et sur la fécondation in vitro d'ovocytes ovins (MIV et FIV respectivement) ont été étudiés dans ce travail. Après la mise au point de divers aspects techniques d'expérimentation et en absence de fécondation effective, c'est sur la maturation extra-ovocytaire (expansion de la corona radiata) que s'est basée l'étude.

Le taux de maturation in vitro est proche de zéro dans un milieu de culture seul ou additionné de FSH. En présence de FSH, la maturation est très bien stimulée par le fluide folliculaire et dans une même mesure par l'IGF, l'EGF et le TNF. Cependant, aucun de ces facteurs ne permet de renforcer l'action du fluide folliculaire. La fécondation n'a pas pu être réalisée pour des raisons techniques développées dans ce travail.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Août 2000

Promoteur : R. Paquay

Co-promoteur : J.-L. Bister

Je voudrais d'abord remercier ma famille sans laquelle rien n'eut été possible.

Je remercie le prof. Paquay, qui a accepté d'être le promoteur de ce mémoire et qui m'a donné la chance de pouvoir travailler dans son laboratoire. Son aide et ses conseils avisés m'ont été précieux.

Merci au Dr J.-L. Bister pour m'avoir suivis en tant que chercheur débutant et pour avoir donné réponse à toutes mes questions, même les plus insignifiantes. Merci aussi à tous les autres membres du labo.

Merci à Katalyn pour son aide dans l'analyse statistique. Merci au Dr Poumay pour m'avoir permis d'utiliser le microscope à fluorescence de son labo ainsi qu'au personnel de celui-ci pour m'avoir guidé dans l'utilisation du microscope.

Un merci particulier à Olivier Gaspard qui m'a beaucoup aidé dans ce travail.

Pour leur amitié qui est un soutien elle-même, je remercie : Denis, Lionel, Olivier, Stéphanie, Jean Pierre, Sébastien, la 9^{ème} Andoy-Wierde,...

Table des matières

Introduction	1
I. Contexte de la recherche	2
II. Présentation du travail	2
Première partie : revue bibliographique	4
Chapitre I : Les facteurs de croissance	5
I. Les IGF ou somatomédines	5
I.1. Récepteurs aux IGF	5
I.2. Protéines liants les IGF	6
I.3. Actions générales des IGF	6
II. Les EGF	6
II.1. Les membres de la famille EGF	6
II.2. Récepteurs et actions	7
III. Les FGF ou GF liants l'héparine	7
III.1. Découverte et formes existantes	7
III.2. Récepteurs	8
III.3. Effets physiologique	8
IV. Les PDGF	9
IV.1. Découverte et formes existantes	9
IV.2. Récepteurs	9
IV.3. Rôles dans la croissance cellulaire	9
V. Les TGF β	10
V.1. Les différents TGF β	10
V.2. Récepteurs	10
V.3. Rôles physiologiques	11
V.4. Actions d'autres membres de la famille des TGF β	11
VI. Les TNF	12
VI.1. Description	12
VI.2. Effets physiologiques	12
Chapitre II : Les facteurs de croissance dans la reproduction	13
I. Dans l'ovaire	13
1. Dans le follicule	13
1.1. Lieux de synthèse des facteurs de croissance	13
1.2. Développement et métabolisme du follicule	14
1.2.1. Les IGF	14
1.2.2. Les TGF β	14
1.2.3. Les TNF	15
1.2.4. Actions d'autres facteurs de croissance	16
1.3. Croissance folliculaire : atresie et dominance	16
1.3.1. L'action des IGF et des IGFBP	16
1.3.2. Actions d'autres facteurs de croissance	17
2. Dans le corps jaune	18
II. Dans la nidation, la placentation et le développement embryonnaire	19
1. Dans le développement embryonnaire	19
1.1. Les IGF	19
1.2. Les EGF	19
1.3. Les PDGF	19
1.4. Les FGF	20
1.5. Les TNF	20
1.6. Actions d'autres facteurs de croissance	20

2. Dans la nidation, la placentation et la gestation	20
2.1. Les IGF	20
2.2. Les EGF	21
2.3. Les TGF β	21
2.4. Les FGF	22
2.5. L'interféron τ	22
2.6. Le TNF α	23
2.7. Actions d'autres facteurs de croissance	23
Chapitre III : La FIVETE (fécondation in vitro et transfert d'embryons)	25
I. La FIVETE	25
1. La récolte des gamètes	25
1.1. Les spermatozoïdes	25
1.2. Les ovocytes	25
1.2.1. Chez la femme	26
1.2.2. Chez les animaux	26
2. La maturation ovocytaire in vitro	27
3. La capacitation des spermatozoïdes	27
4. La fécondation in vitro	28
5. La fécondation assistée	28
5.1. Dépellucidation totale	29
5.2. Dépellucidation partielle	29
5.3. Injection intracytoplasmique du spermatozoïde	29
5.4. Injection sous la zone pellucide du spermatozoïde	30
6. Le développement embryonnaire	30
7. Le transfert d'embryons in utero	30
Chapitre IV : Les facteurs de croissance dans la FIVETE	32
I. Dans la maturation in vitro	32
II. Dans la fécondation in vitro	33
III. Dans le développement embryonnaire	33
IV. Chez le mouton	34
DEUXIEME PARTIE : MATERIEL, METHODE ET MISE AU POINT	35
PERSONNELLE	
Chapitre I : Matériel et méthodes	36
I. Maturation in vitro	36
1. Synthèse des différents milieux	36
2. Récolte des ovocytes	38
3. Traitement et mise en maturation des ovocytes	39
3.1. Les différents milieux de maturation	39
3.2. Traitement et mise en maturation des ovocytes	39
II. Récolte, conditionnement et capacitation des spermatozoïdes	40
1. Les différents milieux utilisés	40
2. Récolte et conditionnement du sperme	43
3. Traitement et capacitation des spermatozoïdes	43
3.1. Centrifugation sur gradient de percoll	44
3.2. Centrifugation sur gradient de PureSperm®	44
3.3. Le « swim-up »	45
3.4. Centrifugations de lavage du sperme frais	45
III. Fécondation in vitro	45
1. Le milieu utilisé	45

2.Fécondation	46
IV. Observation des zygotes	46
1.Liste des produits utilisés	46
2.Méthodes d'observation	47
2.1.Sans coloration	47
2.2.Coloration au fluorochrome de hoechst	47
V. Analyse des résultats	47
1.Résultats des maturations	47
2.Résultats des fécondations	48
Chapitre II : Mise au point personnelle	49
I. Récupération des ovocytes	49
1.De l'abattoir au laboratoire	49
2.Ponction des follicules	50
II. Maturation des ovocytes	51
III. Capacitation des spermatozoïdes	51
1. Tests préliminaires pour le traitement et la capacitation des spermatozoïdes	51
2.Méthode du gradient de percoll	52
3.Gradient de PureSperm®	53
4. »Swim-up »	54
IV. Fécondation	55
1. Problématique	55
2. Discussion du problème	55
TROISIEME PARTIE:RESULTATS EXPERIMENTAUX	57
Chapitre I : résultats expérimentaux	58
I. Les maturations	58
1.Taux de maturation	58
1.1 Rappels préliminaires	58
1.2 . Résultats	58
2.Analyse statistique	60
2.1. Présentation des analyses	60
2.2. Analyses proprement dites	60
2.2.1 Test de Hartley et ANOVA	60
2.2.2 Contrastes « de Scheffé »	61
2.2.3. Contrastes orthogonaux	61
3.Conclusions	62
II. Fécondation	63
Chapitre II : Discussion des résultats	64
I. Maturations	64
II. Fécondation	66
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	67
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	70

Introduction

I. Contexte de la recherche.

Il est courant en expérimentation biologique d'avoir recours à la mise en culture de cellules. Ces cultures se font sur base de milieux de culture contenant divers sels et différentes matières nutritives. Cependant il est nécessaire d'y ajouter des facteurs de croissance et autres cytokines pour stimuler la division, la croissance, la différenciation et l'activité des cellules. C'est pourquoi on ajoute en général un liquide corporel dans le milieu de culture : sérum de veau fœtal pour des cellules somatiques, fluide folliculaire pour les ovocytes en maturation, sérum de brebis en chaleur pour les ovocytes en fécondation.

Ces liquides corporels sont intéressants pour leur contenu riche en facteurs de croissance et en hormones; toutefois, ils posent certains problèmes liés à leur origine animale : milieu mal défini et donc variable, possibilité plus grande de contamination,... C'est pourquoi différentes études ont été menées pour essayer de remplacer ces liquides par des milieux définis. C'est ainsi qu'on essaye de déterminer la composition du fluide folliculaire, du sérum de brebis en chaleur, et que l'on teste des facteurs de croissance et des hormones.

Le but de ce mémoire est d'étudier l'effet des facteurs de croissance (GF) sur le processus de maturation ovocytaire (MIV) et de fécondation in vitro (FIV), afin de remplacer ultérieurement le fluide folliculaire utilisé en MIV par un cocktail de GF, tout en s'assurant que celui-ci n'aura pas d'effet néfaste sur la fécondation (FIV). Dans ce but nous testerons les effets de l'IGF-I, de l'EGF et du TNF α . Par la suite nous réaliserons la fécondation et observerons les résultats de celle-ci après fixation. Nous pourrons en déduire les taux de MIV et de FIV qui nous donneront des réponses aux hypothèses posées au début de ce mémoire. L'absence ou la présence du fluide folliculaire dans les milieux testés devraient alors permettre d'évaluer respectivement l'effet du facteur de croissance seul et l'existence d'un effet additif du facteur de croissance avec le fluide folliculaire.

II. Présentation du travail.

Dans une première partie, une revue bibliographique sur le sujet a été réalisée. Le premier chapitre propose une brève revue des différents facteurs de croissance. Le deuxième montre les diverses implications de ces mêmes facteurs dans la reproduction. Le troisième chapitre explicite la technique de FIVETE (Fécondation In Vitro Et Transfert d'Embryon) et le quatrième chapitre donne un aperçu des connaissances acquises au niveau de l'utilisation des facteurs de croissance dans cette technique.

La deuxième partie traite du matériel et des méthodes utilisés dans ce travail mais aussi de la mise au point personnelle des techniques et de leurs améliorations. Le premier chapitre parle des techniques de maturation in vitro, de capacitation des spermatozoïdes et de fécondation in vitro. Le deuxième chapitre est, quant à lui, consacré à la mise au point personnelle de ce matériel et de ces méthodes.

Enfin, dans la troisième partie, le premier chapitre traitera des résultats obtenus lors des différentes expériences et le deuxième, de la discussion de ces résultats.

Première partie:
Revue
bibliographique

CHAPITRE I :

Les facteurs de croissance.

Ce premier chapitre ne se veut pas être une liste exhaustive de tous les facteurs de croissance connus à ce jour, mais un bref aperçu des principaux facteurs de croissance ayant un rôle dans la maturation et la fécondation ovocytaire, la nidation et le développement embryonnaire. Ceci, afin de situer ces différents facteurs et de garantir une certaine clarté à notre exposé. En effet, la liste des facteurs de croissance impliqués dans ces diverses activités ne cesse de s'allonger de jour en jour et leurs études font l'objet de nombreuses recherches.

I. Les IGF ou somatomédines.

L'IGF-1 ou somatomédine-C (*figure 1*) est un peptide de 70 acides aminés homologues de la proinsuline humaine. L'IGF-II est un peptide de 67 acides aminés homologues de l'IGF-I. L'IGF-I est plus dépendant de la GH et stimule plus la croissance que l'IGF-II, tandis que l'IGF-II a plus d'activités de type insuline que l'IGF-I (Williams, 1994).

I.1 Récepteurs aux IGF.

Il existe deux types de récepteurs aux IGF (IGF-R) : l'IGF-RI et l'IGF-RII (*figure 2*). L'IGF-RI lie préférentiellement l'IGF-I, puis l'IGF-II et dans une moindre mesure l'insuline. Ce récepteur, ainsi que le récepteur à l'insuline, est un hétérotétramère avec deux sous-unités α (130 kDa) extracytosoliques liantes et deux sous-unités β (90 kDa) intracytosoliques à domaines tyrosine kinase qui permettent d'initier la transduction du signal. Ces IGF-RI sont distribués dans tout le corps. Des récepteurs chimériques composés d'une sous-unité $\alpha\beta$ type IGF-RI liée de façon covalente à une sous-unité $\alpha\beta$ type récepteur à l'insuline ont été décrits. L'IGF-II se lie le plus souvent avec le récepteur de type II (220 kDa) qui lui ne possède ni sous-unités dissociables, ni activité tyrosine kinase. Ce récepteur a peu d'affinité pour l'IGF-I et ne lie pas du tout l'insuline. Il est pratiquement identique dans sa composition en acides aminés au récepteur au mannose-6-phosphate cations indépendant (Williams, 1994).

I.2. Protéines liant les IGF.

Il est intéressant aussi de voir qu'il existe 6 protéines, de 200-300 acides aminés, liant les IGF (IGF-BP). Celles-ci sont numérotées de 1 à 6 et se lient avec une affinité plus ou moins grande à l'IGF-I, à l'IGF-II voire aux deux IGF mais avec des affinités différentes.

I.3. Actions générales des IGF.

Les IGF ont de nombreuses actions vu qu'ils sont présents dans de nombreux tissus. On les trouve cependant à des concentrations moindres que dans le sang. Les somatomédines agissent en premier lieu comme des mitogènes dans quelques tissus, stimulent la différenciation cellulaire sans prolifération dans d'autres et stimulent la production de substances cellulaires caractéristiques du tissu dans tous les tissus sensibles. Les IGF-I et -II augmentent la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire dans des cellules de diverses origines embryologiques et dans les organismes allant des invertébrés à l'homme.

De manière plus générale, la GH (Growth Hormone) et donc l'IGF-I, sécrété comme hormone par le foie lors de toute augmentation de GH plasmatique, stimulent l'hématopoïèse, et les IGF stimulent l'action des CSF (Colony Stimulating Factor, qui interviennent dans la formation des différents éléments figurés du sang). IGF-I agit en synergie avec la thyrotropine pour stimuler la division des cellules folliculaires thyroïdiennes. Dans les muscles, les IGF augmentent la prolifération et la différenciation des myoblastes. L'IGF-I permet la médiation de la stimulation de la croissance par la GH dans le squelette...(Williams, 1994).

II. Les EGF.

II.1. Les membres de la famille EGF.

L'EGF murin est le premier à avoir été identifié et ce en 1962 ; il est composé de 53 acides aminés. Il a été extrait de glandes salivaires de souris et se présente comme un hétérotétramère composé de deux molécules d'EGF et de deux protéines liantes de 29 kDa. La forme humaine (*figure 3*) possède 37 acides aminés identiques à l'EGF murin et est aussi appelé urogastrone.

Le TGF α est un autre membre de la famille des EGF. C'est un peptide de type EGF sécrété par beaucoup de tumeurs et capable d'interagir avec le récepteur aux EGF de cellules normales. Il fait 50 acides aminés et possède 35 % d'homologie de séquence avec l'EGF. Le TGF α est aussi produit par des cellules normales telles que celles de la décidue, du système nerveux central ou encore la peau.

Deux autres protéines de la même famille ont été décrites : l'amphiréguline qui est une glycoprotéine de 78 acides aminés possédant une séquence identique à 38 % avec l'EGF (Williams, 1994), et l'HB-EGF (Héparin-Binding EGF) dont le précurseur est un composant du récepteur à la toxine diphtérique (Massagué et Pandiella, 1993).

II.2. Récepteurs et actions.

Le récepteur à l'EGF (EGF-R) possède un poids moléculaire allant de 160 à 190 kDa dans différents tissus suivant sa glycosilation. La liaison de l'EGF à son récepteur est suivie de l'internalisation du complexe EGF-récepteur et d'une régulation du nombre d'EGF-R à la surface de la cellule. L'EGF-R liant l'EGF va dimériser, se transphosphoryler via des domaines intracytosoliques à activité tyrosine kinase et ainsi démarrer une cascade de transduction du signal (*figure 4*) passant notamment par la protéine Ras et les MAP kinases (pour Mitogen Activated Protein Kinase). Cette cascade aboutit finalement à différents facteurs de transcription qui vont ainsi modifier l'expression de certains gènes (in : Lodish et al., Biologie moléculaire de la cellule, 1997). Il existe un autre EGF-R pouvant lier l'amphiréguline.

Les actions de l'EGF se basent surtout sur sa capacité à stimuler la prolifération des couches de cellules basales de l'ectoderme. L'EGF possède des effets sur d'autres processus prolifératifs et développementaux, notamment sur le développement fœtal pour l'EGF et le TGF α (Williams, 1994).

III. Les FGF ou GF liant l'héparine.

III.1. Découverte et formes existantes.

A l'origine, les FGF furent découverts dans des extraits de cerveau et de glandes pituitaires. Deux formes ont tout d'abord été isolées : une forme acide (pI 4,5) appelée aFGF (acid FGF) et une forme basique (pI 9,6) appelée bFGF (basic FGF). La forme basique se trouve dans une série de tissus dérivés du mésoderme et du neurectoderme, tandis que la forme acide est plus confinée aux tissus nerveux et à la rétine. Maintenant on connaît 9 membres dans la famille des FGF (*figure 5*), possédant entre eux de 30 à 70 % d'identité au niveau de leurs séquences en acides aminés. On y retrouve notamment le KGF (pour Kératinocyte Growth Factor ou FGF-7 ; Burgess et Maciag, 1989 ; Basilico et Moscatelli, 1992) et le AIGF (pour Androgen-Induced Growth Factor ou FGF-8 ; Tanaka et al., 1992).

Les FGF ont une propriété unique de liaison à l'héparine d'où le classement dans la famille de FGF d'autres GF liant l'héparine portant le nom d'HBGF (pour Heparin-Binding Growth factor). Des HBGF ont été isolés d'une grande variété de cultures cellulaires, d'extraits d'organes et de tumeurs (Williams, 1994).

III.2. Récepteurs.

Il existe 5 gènes codant pour 5 récepteurs aux FGF (FGF-R) numérotés de 1 à 5. Chaque FGF-R possède lui-même plusieurs variantes. FGFR-1 (*figure 6*), -2, -3, et -4 sont exprimés dans différents tissus embryonnaires. Ils sont aussi exprimés, avec le FGFR-5, dans toute une série de tissus adultes.

La liaison du FGF à son récepteur provoque soit la prolifération, la différenciation, l'inhibition de la différenciation ou encore le maintien d'un phénotype suivant le type cellulaire (Burgess et Maciag, 1989). L'héparane sulfate, un protéoglycan qui lie les FGF avec une faible affinité semble jouer un rôle important au niveau de la liaison de FGF à leurs récepteurs à haute affinité (Kiefer et al., 1990 ; Yayon et al., 1991). La liaison ligand-récepteur provoque la dimérisation du récepteur (avec FGFR-1, -2 ou -3, formant des homo- ou hétérodimères) qui résulte en une activité tyrosine kinase permettant une transphosphorylation du récepteur dimérisé (Bellot et al., 1991; Ueno et al., 1992).

III.3. Effets physiologique.

Les FGF sont des mitogènes pour une large gamme de types cellulaires provenant du mésenchyme ou du neur ectoderme. D'autre part, le aFGF et le bFGF induisent l'angiogenèse *in vivo* et ont des effets chimotactiques et mitogéniques sur les cellules endothéliales *in vitro* (Basilico et Moscatelli, 1992).

Les FGF sont aussi impliqués dans le processus de la différenciation de beaucoup de cellules. Ils stimulent notamment la croissance de neurites de cellules ganglionnaires rétiniennes. La présence des aFGF, bFGF et FGF-5 en abondance dans différents tissus nerveux adultes (cerveau, motoneurones,...) suggère que les FGF jouent un rôle important dans la physiologie neurale chez l'adulte (Tanaka et al., 1992 ; Basilico et Moscatelli, 1992 ; Elde et al., 1991).

Ils sont aussi fort présents dans différents tissus embryonnaires et fœtaux, indiquant ainsi une fonction probable dans le développement (in : Nicos A. Nicolas, Guidebook to cytokines and their receptors, 1997). Ils peuvent enfin retarder la sénescence de cellules en culture parfois de plusieurs dizaines de générations, comme pour les cellules de granulosa (Williams, 1994).

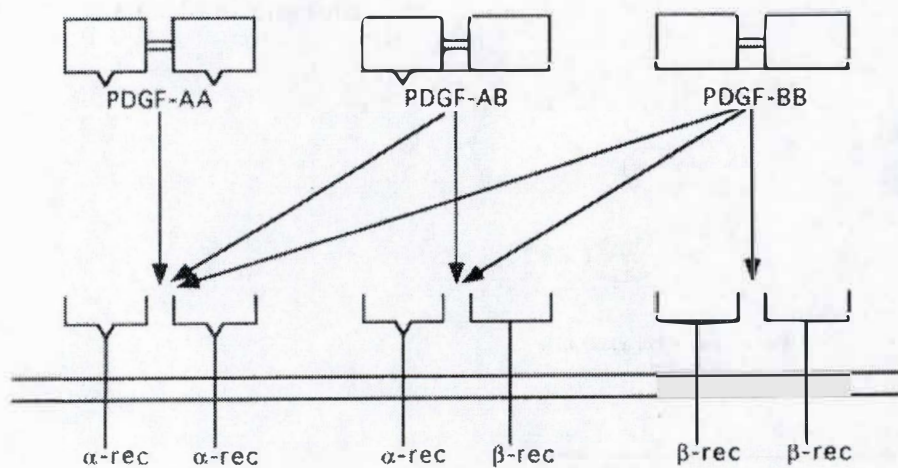


Figure 7 : Liaison des différentes formes du PDGF aux différents récepteurs (in : Nico AN ; « Guidebook to cytokines and their receptors », 1997).

IV. Les PDGF.

IV.1. Découverte et formes existantes.

Le PDGF a été découvert comme étant une substance libérée par les plaquettes lors d'une lésion et agissant comme une hormone de blessure pour stimuler la prolifération des fibroblastes et des cellules musculaires lisses.

Le PDGF est un peptide homo- ou hétérodimérique de 30 kDa hautement basique. Il existe deux chaînes constitutives appelées A et B ayant 60 % d'identité de séquence. On observe deux variantes de la chaîne A. On peut donc trouver naturellement trois formes possibles de PDGF (*figure 7*) : AA, AB et BB (Williams, 1994).

IV.2. Récepteurs.

Deux récepteurs à haute affinité pour les PDGF, d'environ 170 kDa, sont présents dans beaucoup de types cellulaires, surtout d'origine mésenchymateuse. Ces récepteurs sont nommés α et β . Lorsqu'un des monomères se lie à un récepteur α ou β (*figure 7*), il pourra par sa forme dimérique induire la dimérisation du récepteur (le récepteur $\alpha\alpha$ liant plutôt AA, BB et AB ; le récepteur $\alpha\beta$ liant AB et BB et le récepteur $\beta\beta$ liant uniquement BB). Cette dimérisation va permettre une transphosphorylation des domaines intracytosoliques des récepteurs qui possèdent une activité tyrosine kinase. La voie de transduction du signal (*figure 8*) passe comme pour le récepteur à l'EGF par l'activation de Ras et de la voie des MAP kinases pour aboutir à différents facteurs transcriptionnels qui vont être activés (in : Lodish et al., Biologie moléculaire de la cellule, 1997).

IV.3. Rôles dans la croissance cellulaire.

Le PDGF sanguin est concentré dans les granules α des plaquettes où il est stocké jusqu'à ce qu'une blessure ou un autre stimulus vienne activer la dégranulation plaquettaire. Le PDGF rend alors les cellules compétentes à synthétiser de l'ADN, mais nécessite l'intervention d'IGF et d'autres substances qui vont permettre à ces cellules compétentes de passer la phase G1 du cycle pour entrer en phase de synthèse d'ADN.

Lors de blessures, le PDGF est un puissant agent chimotactique qui recrute des macrophages pour ensuite stimuler la prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales (Williams, 1994).

L'expression spécifique du PDGF et de ses récepteurs dans différents tissus lors du développement embryonnaire et fœtal suggère que le PDGF régule la croissance et la différenciation des cellules dans le fœtus et dans le placenta (Palmieri et al., 1993).

V. Les TGFβ.

V.1. Les différents TGFβ.

Les TGFβ sont une superfamille reprenant trois membres homologues (TGFβ1, TGFβ2 et TGFβ3) et un groupe de polypeptides apparentés qui reprend l'hormone antimüllérienne (AMH), l'inhibine, l'activine... Il y a peu, on a isolé et cloné un nouveau membre de la famille TGFβ chez la souris (Dong et al., 1996) puis chez les ovins et les bovins (Bodensteiner et al., 1999). C'est le GDF-9, facteur de croissance et de différenciation numéro 9.

Les 3 TGFβ sont des peptides qui, matures, possèdent environ 75% d'homologie et forment des dimères de 24 kDa composés de deux monomères identiques. L'inhibine, l'activine et l'AMH ont 20 à 40 % d'homologie avec les TGFβ. En culture cellulaire, les TGFβ sont sécrétés sous une forme inactive (*figure 9*) et peuvent alors être activés soit par une association acide-chaude ou encore par un traitement avec une protéase telle que la plasmine ou la cathepsine. Les inhibiteurs de la plasmine vont donc inhiber une partie des actions paracrines médiées par les TGFβ (Williams, 1994).

V.2. Récepteurs.

Trois protéines glycosylées situées en membrane cellulaire et liant les TGFβ ont été identifiées (*figure 10*) comme étant les récepteurs de ceux-ci. Leurs masses respectives sont de 55, 85 et 280 kDa. La protéine de type 3, plus lourde, est en partie constituée d'héparane sulfate et de chondroïtine sulfate. Les récepteurs de type 1 (TGFβ-R1) et 2 sont tous les deux des sérine/thréonine kinases transmembranaires et le signal ne passe que si le TGFβ se fixe à un hétérodimère composé de ces deux protomères. Le mécanisme de transduction du signal n'est pas encore élucidé. Le récepteur de type 3 ajusterait l'accès du TGFβ à l'hétérodimère TGFβ-R1/II transducteur du signal. Il joue donc un rôle modulateur important (in : Lodish et al., Biologie Moléculaire de la cellule, 1997).

V.3. Rôles physiologiques.

Les TGF β ont différents rôles. Les membres de cette famille sont particulièrement intéressants à cause de leur bifonctionnalité. Le TGF β est un inhibiteur potentiel de la croissance, et la production par des cultures de cellules en monocouches de TGF β 2 peut être responsable de l'inhibition de la croissance dépendant de la densité. Le TGF β peut ainsi inhiber la croissance d'à-peu-près tous les types cellulaires, mais son effet le plus important reste celui qu'il exerce sur les cellules épithéliales. Dans certaines circonstances, le TGF β stimule la prolifération de cellules dérivées du mésenchyme telles que les fibroblastes et les ostéoblastes.

Le TGF β illustre bien le fait que la réponse d'une cellule à un signal hormonal puisse être plus déterminé par les conditions environnementales dans lesquelles la cellule se trouve plutôt que par le signal lui-même. En effet, la croissance de fibroblastes en culture est stimulée par le TGF β en présence de PDGF mais est inhibée en présence d'EGF (Williams, 1994).

Une autre série des actions du TGF β comprend celles qui affectent la matrice extracellulaire (MEC). En effet, ce facteur augmente la sécrétion de plusieurs protéines de la MEC et la production d'intégrines et autres récepteurs cellulaires qui lient ces protéines. De plus, il diminue la synthèse de protéases dégradant les protéines de la MEC telles que les métalloprotéases et augmente la production d'inhibiteurs de protéases notamment les inhibiteurs tissulaires (TIMP). Ainsi, l'effet principal du TGF β sur la MEC est d'en augmenter la production et de stimuler l'interaction des cellules avec leur substrat (Derynk, 1994 ; Massagué, 1990 ; Roberts et Sporn, 1990).

Enfin, outre ses rôles au niveau de l'ovaire, le TGF β a un rôle important dans la différenciation du système immunitaire et agit en tant qu'immunosuppresseur (Derynk, 1994 ; Roberts et Sporn, 1990 ; Kehrl, 1991). Il est aussi essentiel pour la réparation tissulaire après une blessure (Amento et Becks, 1991). La distribution étendue du TGF β et de ses récepteurs durant le développement suggère qu'il soit un des acteurs cytokiniques intervenant dans l'embryogenèse (Pelton et al., 1991). Pour terminer, le TGF β 1 stimule la croissance tumorale in vivo, en effet, il est produit dans de nombreuses tumeurs (Arteaga et al., 1993).

V.4. Actions d'autres membres de la famille des TGF β .

Différents rôles sont aussi joués par les autres membres homologues de la famille des TGF β . L'AMH a été décrite premièrement par Jost comme un facteur testiculaire responsable de la régression des canaux müllériens chez les embryons mâles. L'AMH fut ensuite identifiée comme étant homologue au TGF β . Elle est présente dans l'ovaire fœtal ainsi que postnatalement dans les follicules de De Graaf matures. Chez les filles, l'AMH agit comme un inhibiteur de la maturation ovocytaire.

L'inhibine est présente à la fois dans les testicules et dans les ovaires. C'est un hétérodimère avec deux sous-unités α et β liés de façons covalente par des ponts disulfures. La sous-unité β a des homologie de séquence avec le TGF β et l'AMH. L'activine est composée de deux sous-unités β liées de manière covalente. Inhibine et activine ont des effets opposés au niveau de la glande pituitaire et des gonades (Williams, 1994).

VI. Les TNF.

Il y a deux facteurs de nécrose des tumeurs (TNF, pour Tumor Necrosis Factor) : le TNF α et le TNF β (*figure 11*).

VI.1. Description.

Le TNF α est une protéine de 17 kDa produite par les macrophages en réponse à une variété de stimuli incluant les mitogènes, les bactéries, les virus et les parasites. Le TNF α est aussi produit par les lymphocytes B et T, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les seins, les ovaires, les astrocytes, les cellules de Kupffer, les cellules de l'épiderme, les adipocytes et les cellules de la granulosa (Aggarwal, 1992 ; Spriggs et al., 1992).

Le TNF β est une protéine de 25 kDa produite par les lymphocytes suite à différents stimuli antigéniques ou viraux. Outre sa forme sécrétée, il peut s'associer avec une protéine transmembranaire, LT β , pour former un complexe membranaire hétérodimérique. Il peut se lier au deux TNF-R avec des affinités comparables à celles de TNF α (in : Nicos A. Nicolas, guidebook to cytokines and their receptors, 1997). Le TNF β a un spectre d'activités allant de la cytotoxicité à l'induction de l'expression de gènes cellulaires ou viraux et la promotion de la prolifération et/ou de la différenciation cellulaire (Paul et Ruddie, 1988). Ces activités multiples affectent beaucoup de types cellulaires, allant des lymphocytes aux cellules endothéliales, osseuses ou nerveuses.

VI. Effets physiologiques.

In vivo, le TNF α est une cytokine multipotente avec une large gamme d'effets biologiques. Il possède une activité anti-tumorale contre certaines tumeurs solides, mais induit aussi la tumorigenèse. Il peut se lier à deux récepteurs (TNF-R) appelés p55 et p75. Les principales actions du TNF sont médiées par le récepteur p55. Un des rôles du récepteur p75 est de moduler la croissance de certaines cellules.

CHAPITRE II :

Les facteurs de croissance dans la reproduction

I. Dans l'ovaire. (*figures 12 et 13*)

1. Dans le follicule.

1.1 Lieux de synthèse des facteurs de croissance.

Le TNF α (Tumor Necrosis Factor α) est synthétisé au niveau de l'ovocyte lui-même, chez la femme (Marcinkiewicz et al., 1994) à partir de la naissance (Kondo et al., 1995) ainsi que son récepteur p55 (TNF-R II), mais pas le récepteur p 75 (TNF-R I) (Naz et al., 1997) et ce dans les cellules du cumulus oophorus aussi. Il est aussi présent dans le fluide folliculaire (Barak et al., 1992; Wang et al., 1992). Chez la souris, il est présent dans l'ovocyte et dans les cellules folliculaires en général (Chen et al., 1993).

L'IGF-I, quant à lui, est largement synthétisé par les cellules de la granulosa (Monget, 1993) et aussi par les cellules thécales. L'IGF-II est synthétisé par les cellules thécales dans les petits follicules antraux. Le TGF α est lui aussi synthétisé par les cellules thécales et sa concentration diminue dans les follicules préovulatoires. L'INH est synthétisée par les cellules de la granulosa (Besnard et al., 1997).

Le TGF β est lui aussi sécrété par les cellules de la thèque et sa fabrication peut être activée par deux voies : l'une impliquant la protéine kinase C (PKC), l'autre initiée par une stimulation de l'EGF, et impliquant l'activation de la MEK (Mitogen activated protéine kinase Kinase) (Mau et May, 1997). Les gonadotropines FSH-like (comme la PMSG, pour Pregnant Mare's Serum Gonadotropin), quant à elles, stimulent l'expression des TGF β -RII dans les follicules préantraux et antraux (Roy et Carlson, 1997).

Les KGF et le HGF (Hepatocytes Growth Factor) sont produits par les cellules thécales (Parrott et Skinner, 1997). Le VEGF est synthétisé par les péricytes dans les follicules (Doraiswamy et al., 1997) ainsi que par les cellules de la granulosa (Neulen et al., 1995).

1.2 Développement et métabolisme du follicule.

Au niveau des cellules de la granulosa, l'EGF, le TGF α , le bFGF et l'IGF-I stimulent la prolifération tandis que le TGF β l'inhibe. Pour le TNF α , certains auteurs indiquent qu'il a, avec le TGF β , un effet inhibiteur sur la FSH (Maruo, 1995 ; Kondo et al., 1995); d'autres indiquent qu'il a des effets bénéfiques sur la croissance du follicule et donc sur la maturation de l'ovocyte (Naz et al., 1997; Bili et al., 1998 ; Machelon et al., 2000). L'IGF-I stimule aussi la différenciation des cellules de la granulosa tandis que l'EGF, le bFGF et l'activine A l'inhibent.

Au niveau de la thèque, le TGF α possède un effet stimulateur sur la prolifération, par contre, le TGF β inhibe la prolifération mais stimule la différenciation avec l'inhibine. Le TGF α et l'activine A quant à eux inhibent la différenciation des cellules thécales (Besnard et al., 1997). Les actions stimulatrices ou inhibitrices sur la prolifération des cellules granulosales et thécales ont, évidemment, une répercussion sur la croissance folliculaire.

1.2.1 Les IGF ou somatomédines.

Les IGF stimulent la prolifération des cellules de la granulosa et possèdent une action coordonnée avec la FSH (Follicle Stimulating Hormone) pour la différenciation de ces cellules (Besnard et al., 1997) et amplifient l'action de cette même FSH (Maruo T et al., 1995). Ils vont ainsi permettre l'induction de l'activité aromatasase provoquant la production d'oestradiol par les cellules de la granulosa à partir des androgènes produits par les cellules thécales (Davis et al., 1990 ; Campbell et al., 1995 ; Noël et al., 1998a).

Par contre, une préstimulation inhibe l'activité aromatasase et la sensibilité à la LH et à la FSH de follicules prélevés en anoestrus (Noël et al., 1998b). De plus, ils stimulent l'expression des récepteurs à la LH (LH-R) par les cellules de la thèque (Davis et al., 1990 ; Magoffin et Weitsman, 1994). L'IGF-BP3 semble aussi contrôler les fonctions des cellules endothéliales au niveau de la thèque folliculaire (Fraser et al., 1997). Pour finir, les IGF ainsi que l'insuline interviennent dans la prolifération et la différenciation de cellules interstitielles de la thèque (TIC) (Duleba et al., 1997 ; Duleba et al., 1998).

1.2.2. Les TGF β .

Un des principaux modes d'action des TGF β est de contrôler l'expression de la follistatine, qui peut elle-même moduler l'action des TGF β , capables de lier l'activine (Sargüea et al., 1996). D'autre part, le TGF α (un membre de la famille des EGF) stimule la phospholipase A2 cytosolique (cPLA2), tandis que les TGF β l'inhibent. Ceci va provoquer la

production de prostaglandines (PG ; *figure 14*) qui jouent un rôle au niveau de la régulation de l'effet mitogénique des facteurs de croissance (Li et Tsang, 1996).

Le TGF β est impliqué dans le contrôle de la stéroïdogenèse : les cellules de la granulosa qui synthétisent de l'oestradiol inhibent la production de TGF β par les TIC (cellules interstitielles de la thèque). Or les TGF β inhibent la production d'androgènes par les cellules de la thèque. L'action de l'oestradiol sera donc de stimuler la synthèse d'androgènes qui servent de substrat à sa propre synthèse par l'aromatase. Ceci a été démontré in vitro chez le rat (Magoffin et al., 1995). D'autre part, après stimulation à la LH/FSH, les taux de progestérone sécrétés par des follicules préstimulés par du TGF β sont augmentés (Noël et al., 1994). Il aurait aussi un rôle de régulateur négatif des actions de la FSH sur les cellules de la granulosa (Maruo, 1995).

Le GDF-9 (Growth Differentiation Factor-9), qui fait partie de la famille des TGF β , intervient pour coupler l'ovogenèse et la folliculogenèse. Si le gène codant pour GDF-9 subit une délétion, on observe une stérilité des femelles (Albertini et al., 1998). Le rôle du GDF-9 au niveau des ovaires des ruminants domestiques semble se situer surtout au niveau de la folliculogenèse, principalement dans les stades précoces de la croissance folliculaire (Brodensteiner et al., 1999).

L'inhibine, quant à elle, exerce principalement un rôle hormonal de « feed-back » négatif sur la production de FSH ; une immunisation de l'animal contre l'inhibine α augmente le taux d'ovulation (Morris et al., 1995).

1.2.3 Les TNF

Le TNF α influence le développement du follicule dominant en inhibant l'activité de l'aromatase. Il diminue la synthèse de l'oestradiol (pour des ovocytes stimulés au préalable par de l'hCG) et augmente celle de la progestérone. Toutefois, ces effets ne sont pas dose-dépendants et n'affectent ni la viabilité ni la prolifération des cellules de la granulosa. Le TNF α a une action de médiateur, au niveau de troubles de la maturation ovocytaire et de dysfonctionnements endocriniens de l'ovaire. Il permet aussi l'élimination des globules blancs qui se trouvent entre les cellules de la granulosa. Cette utilisation du TNF α permettrait une étude, plus aisée et plus précise, des différentes activités et fonctions des cellules de la granulosa (Best et al., 1994).

Le TNF α serait un régulateur négatif des actions de la FSH sur les cellules de la granulosa (Maruo, 1995). Il apparaît cependant que le lieu de synthèse du TNF α , dans l'ovaire, se trouve dans l'ovocyte lui-même et qu'il participe à la régulation de la croissance, de la régression et de l'atrophie folliculaire (Kondo et al., 1995).

Le TNF α avec le LT B4 (LeukoTriène B4) et l'IL-1 α (Interleukine-1 α) prennent part dans le processus de dégradation de la paroi folliculaire, lors de l'ovulation. Leur concentration au sein du follicule suggère un développement et une maturation folliculaire et ovocytaire optimisée (Bili H et al., 1998). Enfin, le TNF α active la synthèse de certaines chemokines qui favoriseraient les processus de maturation ovocytaire influencés par une accumulation de globules blancs (Machelon et al., 2000).

1.2.4. Action d'autres facteurs de croissance.

Le bFGF et le VEGF stimulent l'angiogenèse durant la folliculogenèse, tandis que le NGF augmente l'innervation folliculaire (Van den Hurk et al., 1997).

Le KGF (de la famille des FGF) et le HGF produits par les cellules de la granulosa interagissent pour exercer un « feed-back » positif régulent le développement folliculaire. Ainsi, différentes hormones, œstrogènes, hormone gonadotrope chorionique (hCG) et FSH, peuvent contrôler la croissance folliculaire via l'expression du KGF, du HGF et du KL (Kit Ligand). Par ailleurs, le KL est nécessaire et suffisant pour induire le développement du follicule primordial dans l'ovaire (Parott et Skinner, 1997).

Le tissu ovarien exprime aussi des GM-CSF et des GM-CSF-R (le récepteur) au niveau du follicule et du tissu lutéal. Les GM-CSF ont un rôle autocrine et paracrine et influencent les stades tardifs du développement folliculaire (pour le GM-CSF thécal) et différentes fonctions ovariennes (pour le GM-CSF lutéal) (Zhao et al., 1995).

1.3 Croissance folliculaire : atrophie et dominance.

Lors d'une vague de croissance folliculaire, toute une série de follicules commencent à se développer, mais tous n'arriveront pas jusqu'au stade de l'ovulation. En effet, un (ou plusieurs selon les espèces) follicule va dominer les autres et se développer à leur détriment. Ce follicule est appelé « dominant », les autres sont dits « subordonnés » et subiront l'atrophie folliculaire qui est, en fait, une dégénérescence. Plusieurs facteurs de croissance semblent impliqués dans ces processus de dominance et d'atrophie folliculaire ; on retrouve les IGF et leurs IGF-BP, les EGF,...

1.3.1 L'action des IGF et des IGFBP.

Les IGF et les IGFBP sont exprimés au niveau du follicule. L'IGF-II est par ailleurs plus exprimé dans les gros follicules (Ward et al., 1997). On retrouve aussi dans le fluide

folliculaire les IGFBP-2,-3,-4 et -5. Or, lors de la croissance folliculaire, on observe dans le fluide folliculaire une petite augmentation de l'IGFBP-3 et une diminution des IGFBP de moins de 40 kDa (2, 4 et 5 chez le mouton), ce qui est lié à une diminution de leur synthèse et une augmentation de leur dégradation (pour l'IGFBP-4). Par contre, lors de l'atrésie, on peut mesurer une augmentation des IGFBP-2,-4 et -5 et une diminution de l'IGFBP-3. On a pu en effet détecter une diminution des activités protéolytique envers les IGFBP-4 et -5 dans les follicules atrétiques (De la Sota et al., 1996 ; Besnard et al., 1997 ; Yuan et al., 1998).

Cette diminution des IGFBP de moins de 40 kDa lors du développement folliculaire dans les larges follicules antraux est responsable d'une augmentation de concentration en IGF et par conséquent d'une amplification de l'action des gonadotropines, les IGF augmentant celle de la FSH au niveau du follicule. On peut se souvenir du fait que la FSH provoque les vagues de croissance folliculaire, tandis que la LH (Hormone Lutéinisante) stimule le développement folliculaire terminal et l'ovulation (Choi et al., 1997 ; Besnard et al., 1997). D'autre part, la GH, agissant par l'intermédiaire de l'IGF-1 de production locale, va diminuer l'apoptose des cellules folliculaires. De plus, une augmentation d'IGFBP-2 dans le follicule entre les jours 5 et 7 après l'oestrus chez le porc augmente l'apoptose des cellules granulosales et l'atrésie folliculaire. L'IGF-I agit donc comme un facteur de survie folliculaire (Guthrie et al., 1995 ; Eisenhauer et al., 1995).

Pour conclure, les IGF stimulent, de part leur effet au niveau de l'action de la FSH, le lancement des vagues de croissance folliculaire. Les concentrations variables des IGFBP vont permettre à la dominance et à l'atrésie folliculaire de prendre place. D'autre part, l'IGF-II produit dans les follicules et le corps jaune est probablement un régulateur important de la folliculogénèse agissant via les récepteurs IGF-RI (Dawson et al., 1997).

1.3.2. Actions d'autres facteurs de croissance.

D'autres facteurs de croissance que les IGF (et leurs IGFBP) influencent les vagues de croissance folliculaire. L'EGF joue un rôle dans l'induction de l'atrésie. L'inhibine, synthétisée par les cellules de la granulosa, voit sa concentration augmenter avec la taille du follicule (Besnard et al., 1997). Les activines A et B diminuent la production des IGFBP-4 et -5 (Choi et al., 1997). Les FGF et EGF participent tous deux à l'initiation des vagues de croissance folliculaire (Besnard et al., 1997).

D'autre part, la diminution du taux de TGF β et l'augmentation de taux de bFGF et de FGF-R dans les cellules thécales des follicules dominants se font en parallèle à une augmentation de l'expression des FSH-R, ainsi que de l'activité aromatasase. Ceci suggère que ces facteurs de croissance jouent un rôle important dans la sélection et dans la dominance folliculaire (Schams et al., 1997).

2. Dans le corps jaune.

Le VEGF stimule la vascularisation du corps jaune et est synthétisé par les cellules de la granulosa (Neulen et al., 1998 ; Doraiswamy et al., 1998). Il est aussi produit par les péricytes dans les follicules et le corps jaune et a donc un rôle critique dans les événements angiogéniques : il permet la transformation du follicule en un corps jaune très vascularisé (Doraiswamy et al., 1997). Etant donné son action, le VEGF va aussi stimuler le développement du corps jaune et la production de progestérone (Anasti et al., 1998).

On a pu montrer la présence des mRNA des IGFBP-2, -3 et -4 dans des extraits de corps jaune (Woad et al., 1997). L'IGFBP-3 semble contrôler les fonctions des cellules endothéliales de ce tissu (Fraser et al., 1997). L'IGF-I y stimule la lutéinisation (Pescador et Murphy, 1998) et la sécrétion pulsatile in vitro de progestérone (Khan-Dawood et al., 1994). Plusieurs faits indiquent que le système IGF joue un rôle décisif pour le contrôle autocrine et paracrine du corps jaune (Zhaoping et al., 1998). La GH joue elle-même un rôle important dans la fonction lutéale (Ikeda et al., 1997).

Contrairement à l'IGF qui stimule la lutéinisation, l'EGF induit la mitogenèse de la granulosa et son maintien dans un stade indifférencié. Ils possèdent donc dans la formation du corps jaune des actions antagonistes (Pescador et Murphy, 1998).

Le TGF β -R-II, exprimé dans les follicules antraux et préantraux (Roy et Carlson, 1997) participe à la lutéinisation (Wehrenberg et Rune, 1998).

Un TNF α -R est produit au niveau du corps jaune durant tout le cycle. Le TNF α joue donc un rôle au niveau de la phase lutéale et de la lutéolyse (Sakumoto et al., 1998). Ce sont les macrophages qui sont la source principale du TNF α dans le corps jaune (Zhao et al., 1998).

Le KGF synthétisé par le corps jaune permet une communication paracrine entre les cellules de la thèque et les petites cellules lutéales (Salli et al., 1998).

II. Dans la nidation, la placentation et le développement embryonnaire. (*figure 15*)

1. Dans le développement embryonnaire.

1.1 Les IGF.

Les IGF produits par la mère pourraient être régulés par les IGFBP embryonnaires pour aider au développement préimplantatoire de l'embryon (Winger et al., 1997). L'IGF-RI et les IGF-I/II exprimés dans l'oviducte forment un système autocrine et paracrine permettant la mise en place d'un milieu adéquat pour le développement embryonnaire. L'IGF-I en particulier, produit dans l'oviducte et l'utérus, stimule le développement embryonnaire du stade morula au stade blastula. En fait, il se lie aux embryons préimplantatoires et démarre le développement embryonnaire précoce. Il a donc un rôle dans l'interaction mère-embryon (Herrler et al., 1997 ; Herrler et Beier, 1995 ; Lighten et al., 1997, 1998). L'insuline aussi intervient en stimulant les clivages embryonnaires (Gandolfi, 1992).

1.2. Les EGF.

Des TGF α endogènes peuvent fonctionner comme des facteurs de survie cellulaire lors du développement préimplantatoire de l'embryon en réduisant l'apoptose des cellules (Brison et Schultz, 1997a ; 1997b ; 1998). Le TGF α , agissant via l'EGF-R, stimule la prise d'acides aminés et leur incorporation par l'embryon, l'expansion du blastocoele et la synthèse de protéines dans l'espace périvitellin et le blastocoele (notamment des gélatinases). Cette action se déroule surtout entre les jours 3 et 8 de gestation pendant lesquels on observe une augmentation de la concentration de TGF α et d'IGF-II (Gandolfi, 1992).

1.3. Les PDGF.

Le PDGF stimule l'embryon et y est présent de même que dans l'épithélium de l'oviducte (Gandolfi, 1992)

1.4. Les FGF ou GF liant l'héparine.

Le bFGF est aussi présent dans l'embryon et dans l'épithélium de l'oviducte et stimule la formation du blastocyste (Gandolfi, 1992). Le FGF permet entre autre une régulation autocrine et paracrine au niveau de l'oviducte comprenant les cellules de l'oviducte

et les complexes ovocyte-cumulus (Gabler et al., 1997 ; Gabler et Einspanier, 1998). Il possède donc un rôle dans le développement précoce de l'embryon (Hrabé de Angelis et al., 1995).

1.5. Les TNF.

Le $\text{TNF}\alpha$ inhibe la prolifération et la différenciation des cellules souches embryonnaires (ou ESC pour Embryo Stem Cell) dans les corps embryonnaires (Wuu et al., 1998). Il diminue ainsi l'aptitude des embryons à se différencier en fœtus après l'implantation (Wuu et al., 1999).

1.6. Actions d'autres facteurs de croissance.

Le VEGF joue un rôle important au niveau de l'angiogenèse fœtale (Redmer et al., 1997).

2. Dans la nidation, la placentation et la gestation.

2.1. Les IGF.

Les deux somatomédines sont exprimées durant la phase de formation de la déciduale et l'expression d'IGF-I et d'IGFBP-4 est associée avec la décidualisation des cellules du stroma utérin (Henemyre et Markoff, 1998). Elles possèdent une fonction autocrine et paracrine dans la différenciation de l'endomètre suite à l'implantation de l'embryon ainsi que dans la croissance et l'invasivité du trophoblaste (Correia da Silva et al., 1993 ; Hamilton et Lala, 1999). L'IGFBP-5 est synthétisée dans les tissus utérins et placentaires et est un régulateur important de la croissance placentaire médiée par les IGF (Reynolds et al., 1997). L'IGFBP-2 est aussi un régulateur des actions de l'IGF-II au niveau de l'utérus (Badinga et al., 1997).

Chez le fœtus, les taux d'IGF-I/II et des IGFBP-2/3 augmentent avec le temps de gestation et, chez la mère, c'est le taux d'IGF-I qui augmente (Langford K et al., 1998). Le taux d'IGF-II, quant à lui, régule la composition des tissus fœtaux et extra-embryonnaires (Gardner et al., 1999). Ceci implique un rôle important du système IGF dans la gestation.

2.2. Les EGF.

Les EGF (EGF, TGF α , HB-EGF et amphiréguline) sont présents dans l'utérus et peuvent agir sur les EGF-R situés sur les blastocystes. Ils interviennent dans l'implantation de l'embryon (Dey, 1995). De plus, l'EGF est exprimé par l'endomètre et l'EGF-R se retrouve sur l'allantochoirion fœtal et l'endomètre maternel. Il y a donc une influence de l'EGF au niveau de la croissance de ces deux tissus (Lennard et al., 1998). D'autre part, le HB-EGF stimule la prolifération et la différenciation de l'endomètre humain in vitro (Austin et al., 1998).

On a pu montrer qu'il existe une interaction entre l'oestradiol et l'EGF dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation de l'endomètre. En effet, l'EGF et l'oestradiol stimulent tous deux la croissance utérine et vaginale chez la souris, mais si on utilise des anticorps contre l'EGF, on inhibe l'action de l'oestradiol (Mellor et Thomas, 1995).

L'importance des EGF durant la gestation chez la truie est démontrée par l'exemple suivant : il existe dans la lumière utérine une forme tronquée de l'EGF-R et des taux élevés de ce récepteur coïncident avec un établissement de gestation raté (Kliem et Fischer, 1997). D'autre part, la présence de ce récepteur aux EGF seul au niveau de l'endomètre utérin porcin montre que les EGF du fluide utérin ont des effets sur les embryons et non sur la paroi utérine (Kliem et al., 1998).

Enfin, l'EGF intervient au niveau de la placentation pour stimuler la prolifération des cellules endothéliales des artères fœtoplacentaires (Zheng et al., 1997).

Le TGF α établit un échange d'informations de type juxtacrine entre les cellules de l'endomètre, les cellules de l'épithélium luminal et les cellules de l'embryon préimplantatoire, toutes ces cellules exprimant l'EGF-R (Bush et al., 1998).

2.3. Les TGF β .

Les TGF β (1, 2 et 3) ainsi que les TGF β -RI/II se retrouvent dans le conceptus préimplantatoire et périimplantatoire et possèdent un rôle dans l'implantation (Gupta et al., 1997) et dans le développement du conceptus (Gupta et al., 1998a ; 1998b ; Nowak RA, 1999, Flores et al., 1998) en intervenant dans les interactions autocrines et paracrines entre l'utérus et le conceptus (Gupta et al., 1998a).

D'autre part, le TGF β -1, présent dans le liquide séminal et transféré à l'utérus lors de la reproduction, stimule la production de GM-CSF ainsi que le recrutement de cellules

inflammatoires au niveau de l'utérus. Il va donc provoquer des changements immunologiques de l'utérus durant la période préimplantatoire (Tremellen, 1998).

2.4. Les FGF.

L'utérus synthétise des FGF-1 et -2 et cette synthèse est régulée par l'oestradiol. Ces facteurs de croissance possèdent différentes localisations dans l'utérus (Samathanam et al., 1998). Ils interviennent aussi pour stimuler la prolifération des cellules endothéliales des artères fœtoplacentaires (Zheng et al., 1997).

Tout comme on trouve des KGF-R dans l'endomètre utérin et dans la peau fœtale (Liu et al., 1997), on trouve aussi le KGF et ses récepteurs dans l'utérus (Rocca et Koos, 1997), l'oviducte et le vagin (Slayden et al., 1997) où il stimule la prolifération des cellules endothéliales.

2.5. L'interféron τ .

L'IFN τ joue un rôle primordial dans l'établissement de la gestation (Johnson et al., 1998). C'est un signal de reconnaissance de la gestation chez les ruminants (Spencer et al., 1996b). Il est synthétisé aux jours 12-13 de gestation chez la brebis et aux jours 14-17 de gestation chez la vache et la chèvre (Bazer et al., 1996).

L'ocytocine (OT) est responsable de la sécrétion épisodique de la prostaglandine F2 α (PGF2 α) par l'utérus des ruminants. Pour rappel, la PGE2 est lutéotrope (elle stimule le développement du corps jaune et la sécrétion de progestérone) au contraire de la PGF2 α qui est lutéolytique. La PGE2 va donc permettre le maintien de la gestation tandis que la PGF2 α va l'empêcher. L'atténuation de la production de PGF2 α par l'IFN τ est donc essentielle pour la prévention de la lutéolyse durant la gestation chez les ruminants (Xiao et al., 1999). Par contre, l'IFN τ stimule la production de PGE2 (Asselin et al., 1997).

Cette action de l'IFN τ sur la synthèse des PG est due à une régulation de l'expression des récepteurs à l'ocytocine, eux-mêmes induisant la transcription de la COX-2 (cyclooxygénase-2 qui est la forme inductible d'une enzyme intervenant dans la synthèse des prostaglandines) et de la PGF Synthase (Xiao et al., 1999). L'IFN τ va ainsi, via IRF-2 (IFN τ -induced Regulatory Factor like 2), diminuer l'expression du récepteur aux oestrogènes et (directement ou indirectement) du récepteur à l'ocytocine par l'endomètre, ce qui empêche alors la sécrétion de PGF2 α qui est indispensable pour la lutéolyse (Bazer et al., 1996 ; Spencer et al., 1996a ; Spencer et Bazer, 1996 ; Bazer et al., 1997). On a d'ailleurs pu montrer que des injections intrautérines d'IFN τ altéraient l'expression des récepteurs à l'ocytocine et aux oestrogènes (Spencer et al., 1995a ; Spencer et al., 1995b).

Pour résumer, la synthèse d'IFN τ par le trophoblaste diminue, via une régulation de l'expression des récepteurs à l'ocytocine, de la COX-2 et de la PGFS, la synthèse de la PGF2 α au profit de la PGE2. Ceci va permettre un maintien du corps jaune et donc un maintien de la gestation.

L'IFN τ est aussi très important dans les différents aspects immunologiques de la gestation. Par exemple, il stimule l'expression des complexes majeurs d'histocompatibilité de type I, mais pas ceux de type II (Todd et al., 1998). D'autre part, l'IFN τ régule la production de la bGCP-2 (bovine Granulocyte Chemotactic Protéin-2) qui est un facteur important pour la détermination de l'environnement cytokinique dans l'utérus. De plus, la régulation de l'inflammation et de l'angiogenèse par la bGCP-2 en collaboration avec d'autres cytokines est nécessaire pour l'établissement de la gestation précoce et de l'implantation de l'embryon (Teixera et al., 1997).

2.6. Le TNF α .

Le TNF α , agissant via ses récepteurs, induit la croissance du compartiment spongiotrophoblastique du placenta, même s'il inhibe la croissance du trophoblaste le jour 3 de gestation (Rasmunssen et al., 1997). La source principale de TNF α utérin se situe dans les cellules mastocytaires (Roby et Hunt, 1995).

2.7. Actions d'autres facteurs de croissance.

Les couches épithéliales fœtales et maternelles produisent aussi du VEGF qui permet d'augmenter la croissance locale des capillaires pour obtenir un meilleur réseau vasculaire pour le transfert des nutriments et des déchets au niveau du placenta (Charnock-Jones et al., 1997 ; Redmer et al., 1997). Le VEGF a aussi un rôle dans le remodelage de l'endomètre pour l'implantation et la gestation (Koos et al., 1998). Enfin, le VEGF, en plus de son rôle angiogénique, stimule la prolifération des cellules du trophoblaste extravilleux durant le développement placentaire (Athanassiades et al., 1998).

La relaxine semble avoir un rôle dans la vascularisation de la muqueuse utérine en induisant la synthèse de VEGF et en provoquant ainsi l'angiogenèse au niveau de l'endomètre (Unemori et al., 1997 ; Grove et al., 1998). Par contre, le placenta sécrète le sFlt-1 (fms-like-tyrosine kinase) qui est un antagoniste du VEGF et qui est donc important dans la régulation des effets du VEGF et nécessaire pour une gestation réussie (Clark et al., 1998).

In vitro, le HGF stimule la prolifération et la migration des cellules épithéliales de l'endomètre, ce qui indique un rôle possible dans la régénération de l'endomètre utérin après les menstruations (Sugawara et al., 1997 ; Lindsey et Brenner, 1998).

Le CTGF (Connective Tissue Growth Factor), présent dans l'endomètre et la décidue utérine, ainsi que dans le trophoblaste, voit sa concentration augmenter avec le temps de gestation. Il stimule la prolifération des cellules musculaires lisses et des fibroblastes et a probablement un rôle dans la gestation et le développement embryonnaire (Uzumeu et al., 1998 ; Surveyor et Brigstock, 1998).

CHAPITRE III :

La FIVETE (Fécondation In Vitro Et Transfert d'Embryons).

I. La FIVETE.

1. La récolte des gamètes.

1.1. Les spermatozoïdes.

Il existe, chez les animaux, plusieurs techniques pour récolter le sperme. La plus fréquemment utilisée est celle du vagin artificiel (*figure 16 et 17*), constitué d'un manchon rigide doublé à l'intérieur d'un manchon en caoutchouc souple. Entre les deux se trouve de l'air ou de l'eau à environ 40°C. Le tout est prolongé par un cône récolteur et un tube gradué ou un bidon pour les espèces à grand volume spermatique. Le vagin artificiel est placé sur le pénis du mâle au moment où il s'apprête à saillir une femelle en chaleur. La taille du vagin artificiel est, évidemment, bien adaptée à la taille du pénis de l'animal.

Une autre technique utilisée chez le taureau et le bétail est l'électroéjaculation. Elle est utilisée si l'animal n'est plus capable de saillir ou s'il refuse le vagin artificiel. L'électroéjaculateur (*figure 18*) consiste en un tube en plastique avec deux lames métalliques qui constitue les électrodes. Après son introduction dans le rectum, des trains d'impulsions sont émis, à une fréquence de 10 Hz et une tension de 12 V. La stimulation se fait au niveau de la limite des vertèbres lombaires et sacrées où se trouve la zone médullaire responsable du contrôle du réflexe d'éjaculation. La stimulation va provoquer l'érection, puis l'éjaculation suite à une stimulation prolongée. Cette technique reste toutefois stressante pour l'animal.

Enfin, on trouve les techniques de massage chez le chien et le coq, ainsi que le condom chez les étalons qui refusent parfois le vagin artificiel (Bister, 1999).

1.2. Les ovocytes.

Pour la récolte des ovocytes, la méthode la plus fréquemment utilisée reste le pick-up ovocytaire (OPU) qui consiste à aspirer le contenu des follicules antraux. Chez la femme, l'OPU se pratique par échographie transvaginale sur les follicules préovulatoires avec des

ovocytes mûrs, ce qui permet de passer outre la maturation in vitro des ovocytes. Chez les animaux, en général, l'OPU se pratique à n'importe quel moment du cycle. Elle nécessite alors une plus grande force d'aspiration pour récolter l'ovocyte associé au cumulus oophorus (COC pour complexe ovocyte-cumulus), et lié à la granulosa.

1.2.1. Chez la femme.

Chez la femme, comme on ne récolte que les ovocytes prêts à ovuler, on a souvent recours à un traitement hormonal destiné à provoquer une superovulation suite à laquelle on pourra récolter plusieurs ovocytes mûrs.

Ce traitement comprend en général de la hMG (pour human Menopausal Gonadotrophin) qui est extraite de l'urine de femme ménopausée et possède un effet FSH et de la hCG (pour human Chorionic Gonadotrophin) qui est extraite de l'urine de femme enceinte et qui possède un effet LH. Le traitement à la hMG est destiné à stimuler le développement de follicules antraux. Lorsque leur nombre est suffisant et que leur diamètre approche 16 mm (ceci est vu par contrôle échographique), on passe à un traitement hCG. La hCG va provoquer l'ovulation en mimant la décharge préovulatoire de LH. Parfois, l'hCG n'est pas injectée et le biologiste suit l'apparition du pic naturel de LH via des dosages fréquents. L'OPU se pratique 4 à 6 h avant le moment normal de l'ovulation (Bister, 1999).

Une longue aiguille de ponction est fixée sur le dos d'une sonde endocavitaire d'échographie. Lorsque le follicule est choisi, l'aiguille est avancée à travers la paroi vaginale jusque dans le follicule. Une dépression permet d'aspirer le fluide folliculaire (FF) dans lequel se trouve le COC, puis, par une deuxième voie, on rince et on réaspire le follicule. Les tubes contenant le FF et les COC sont maintenus à 37°C. Enfin, on trie et on lave les COC sous hotte à flux laminaire.

1.2.2. Chez les animaux.

En général, on ne procède pas à un traitement superovulatoire, bien que cela se passe de plus en plus souvent. On va alors ponctionner des ovocytes immatures pour ensuite procéder à leur maturation in vitro. Chez la vache, la ponction se fait par voie transvaginale. Pour d'autres animaux (mouton, chèvre, porc...), cette ponction se fait par laparoscopie transabdominale, bien qu'une nouvelle technique d'OPU transvaginale ait été mise au point chez la chèvre (*figure 19*). Enfin, si on ne fait pas de ponction sur une femelle particulière, l'OPU peut se faire sur des ovaires provenant d'un abattoir, si ceux-ci ont été récoltés dans du liquide physiologique à 39° C, y restent moins de 5 h (Bister, 1999) et si les ovocytes sont mis en culture moins de 5 h après la récolte des ovaires (Bister, 1999).

2. La maturation ovocytaire in vitro.

Les ovocytes ponctionnés de follicules qui ne sont pas préovulatoires doivent être maturés in vitro pour pouvoir être fécondés. Les ovocytes collectés sont triés et seuls ceux qui présentent un cumulus d'au moins deux couches cellulaires continues sont conservés. Ils sont alors lavés dans du milieu stérile contenant des antibiotiques, ce qui permet d'éviter les risques de contamination, pour être ensuite transférés dans le milieu de maturation proprement dit. Ce milieu a une composition variable d'un laboratoire à un autre. Il comprend un milieu de base (TCM199, Ham F10...), plus de la LH et de la FSH (pour mimer le pic préovulatoire), de l'oestradiol et parfois du fluide folliculaire.

Les boîtes de maturation in vitro (boîtes multipuits) sont ensuite placées dans une étuve à 39°C contenant 5 % de CO₂ et 95 % d'humidité relative. Le CO₂ permet un équilibre entre l'atmosphère gazeuse et le bicarbonate en solution dans le milieu, ce qui améliore le pouvoir tampon de l'ensemble. La maturation dure à peu près 20h et on peut l'observer grâce au phénomène le plus visible qui est l'expansion du cumulus oophorus qui forme alors la couronne radiata (maturation extraovocytaire) (Bister, 1999).

3. La capacitation des spermatozoïdes.

La première chose que l'on fait après la récolte du sperme est de l'analyser. On procède alors à un comptage du nombre de spermatozoïdes en cellule de type hématimétrique (Bürker, Thomas...) ainsi qu'à une évaluation de leur motilité. Les plus féconds sont les fléchants c'est-à-dire ceux qui se déplacent de façon rectiligne. On peut aussi évaluer la proportion de morts par une coloration à l'éosine / nigrosine qui ne colore que les morts (en rose) car ces colorants vitaux sont rejetés par les vivants.

La capacitation des spermatozoïdes est indispensable à l'acquisition de leur pouvoir fécondant. Le milieu de capacitation contient un ensemble de sels minéraux, un tampon et des éléments nutritifs. La dilution du sperme constitue en elle-même le début de la capacitation car elle dilue des facteurs de décapacitation présents dans le plasma séminal. Le milieu peut aussi contenir de l'héparine, du calcium ou encore de la BSA (Albumine Sérique Bovine) qui sont des facteurs de capacitation. Ces facteurs ne sont pas constants pour les différentes espèces. Enfin, le pH du milieu de capacitation doit tourner autour de 7,3.

Pour sélectionner les spermatozoïdes vivants, on peut faire une centrifugation sur un gradient de percoll (90 et 45 %) à 2500RPM pendant 20 minutes (*figure 20*). Les spermatozoïdes vivants, un peu plus denses, se retrouvent en majorité dans le culot de sédimentation tandis que les morts s'arrêtent à l'interface des deux concentrations de percoll et le dilueur ou le plasma séminal en surface.

Une autre technique utilisée est celle du « swim-up » (*figure 21*). Elle consiste à centrifuger le sperme dilué de façon à obtenir un culot de spermatozoïdes. Le surnageant est alors éliminé et du milieu de capacitation est déposé délicatement sur le culot. Le tout est laissé à l'étuve pour une petite heure. Les spermatozoïdes vivants, les plus mobiles, arriveront à se dépêtrer du culot et migreront alors dans le surnageant. On peut ainsi les récupérer. Le problème de cette technique est la perte d'une bonne portion de gamètes qui, situés plus profondément dans le culot, y restent bloqués.

Il faut remarquer que cette capacitation ne doit pas durer trop longtemps sinon la réaction acrosomiale risque de commencer en l'absence des ovocytes, ce qui fait autant de spermatozoïdes de perdus. Chez le bélier, elle dure 1 à 2 h pour du sperme congelé et de 2 à 4h pour de la semence fraîche (Bister, 1999).

4. La fécondation in vitro.

Pour la fécondation, on rassemble dans un puits les ovocytes maturés et les spermatozoïdes capités. Les COC sont lavés plusieurs fois dans du milieu par des aspirations successives avec une pipette pasteur effilée, ce qui permet d'enlever la majorité des cellules de la corona radiata. On peut aussi ajouter de la trypsine ou de la hyaluronidase, protéases qui facilitent l'opération. On remarquera cependant que de plus en plus d'auteurs n'enlèvent plus ces cellules et ce sans affecter le taux de fécondation.

Le milieu de fécondation est souvent proche du milieu de capacitation, de telle sorte que la capacitation peut se poursuivre jusqu'à la fécondation. Il est maintenu à pH 7.7 dans l'étuve à CO₂.

Les spermatozoïdes sont dilués jusqu'à une concentration de 10^5 par 100 μ l. Les ovocytes sont mis dans un puits où l'on ajoute les spermatozoïdes. Après 24 h, on lave les zygotes et on les met dans un milieu de développement embryonnaire.

On peut fixer une partie des ovocytes pour évaluer le taux de fécondation par observation des deux pronuclei (*figure 22*). Cette fixation se fait dans un mélange de méthanol et d'acide acétique qui fixe la cellule et éclaircit son cytoplasme (Bister, 1999).

5. La fécondation assistée.

Lorsque c'est chez la femme que l'on a un problème, par exemple de type obstruction des trompes de fallope, on procède alors à une FIVETE classique. Mais si c'est un problème au niveau du sperme qui n'est pas assez abondant ou motile, on peut utiliser la

banque de sperme de l'hôpital. Dans le cas contraire, où la déficience n'est pas trop grave, on peut avoir recours à des techniques plus ou moins invasives qui facilitent la rencontre de l'ovocyte et du spermatozoïde (*figure 23*).

5.1. Dépellucidation totale.

La technique de dépellucidation totale de l'ovule reste limitée à des études expérimentales pour évaluer la fécondance des spermatozoïdes, en évaluant la capacité de ceux-ci à pénétrer un ovule de hamster. En effet, la zone pellucide semble nécessaire pour assurer la cohésion des blastomères, la protection de l'œuf au début du développement et probablement l'action des facteurs de croissance sécrétés par les blastomères (Testart et Lassalle, 1989).

5.2. Dépellucidation partielle.

Le « zona drilling », ou perforation chimique de la zone pellucide, est réalisé à l'aide d'un milieu tyrode acidifié, sous contrôle d'un équipement de micromanipulation. De cette manière, le spermatozoïde peut pénétrer via ces pores artificiels et cette pénétration ne dépend plus d'une interaction spécifique entre la zone pellucide et le spermatozoïde (Testart et Lassalle, 1989).

Le « zona cutting », ou perforation mécanique de la zone pellucide, est la réalisation de pertuis dans la zone pellucide à l'aide d'une microaiguille. Le taux de fécondation est plus faible qu'avec le zona drilling mais l'embryon est moins souvent endommagé (Testart et Lassalle, 1989).

5.3. Injection sous la zone pellucide du spermatozoïde.

La zone pellucide n'est pas détruite mais seulement perforée et le cytoplasme ovocytaire est respecté, tout comme pour les techniques de zona drilling/cutting. Mais contrairement à ces techniques, on peut ici sélectionner les spermatozoïdes et n'en introduire qu'un nombre limité, le plus souvent trois dans l'espace périvitellin, entre la membrane plasmique et la zone pellucide. Le taux de polyspermie est proportionnel au nombre de spermatozoïdes injectés (Testart et Lassalle, 1989).

5.4. Injection intracytoplasmique du spermatozoïde.

L'ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection) comporte l'effraction de la zone pellucide et de la membrane plasmique et l'injection d'un spermatozoïde dans le cytoplasme ovocytaire (*figure 24*). L'avantage est que l'on peut réaliser une fécondation avec un seul spermatozoïde, voire même une tête ou noyau de spermatozoïde. L'ovocyte déclenchera les processus de décondensation du noyau et de formation du pronucleus mâle (Testart et Lassalle, 1989).

6. Le développement embryonnaire.

Comme pour la maturation in vitro, de nombreux milieux différents ont été mis au point pour permettre le développement embryonnaire car celui-ci reste limité si l'embryon ne rencontre pas les conditions optimales présentes dans l'oviducte. Chez l'homme, l'utérus accepte des embryons qui n'ont pas encore le développement qu'ils devraient avoir dans des conditions naturelles. Par contre, chez les animaux, on ne transfère que les blastocystes ou des embryons à des stades très proches de celui qu'ils auraient acquis s'ils avaient été conçus naturellement par la mère porteuse.

Le milieu le plus connu qui permet un développement des premiers stades embryonnaires (*figure 25*) est le SOF (pour Synthetic Oviductal Fluid). Il ne permet cependant pas d'atteindre le stade blastula, qui nécessite une coculture avec des cellules de l'oviducte ; ces cellules synthétisent toute une série de facteurs de croissance nécessaires à l'embryon dont la nature est encore en grande partie inconnue.

Le développement embryonnaire se fait dans un milieu le moins volumineux possible, pour que les différents facteurs sécrétés par les embryons soient suffisamment concentrés. C'est pourquoi il se fait dans des gouttelettes de quelques microlitres de SOF et sous une couche d'huile minérale. Celle-ci empêche d'avoir une évaporation du milieu qui en modifierait l'osmolarité et l'acidité, et elle diminue la concentration en O₂ dissout, reconstituant ainsi des conditions proches de celles de l'utérus.

Les embryons sont enfin transférés dans un utérus ou congelés (Bister, 1999).

7. Le transfert d'embryons in utero.

Le transfert d'embryons peut se faire à partir d'embryons obtenus naturellement, après insémination artificielle et rinçage de l'utérus ou par FIVETE. Dans le cas du transfert d'un embryon venant d'une mère donneuse à une mère receveuse, une synchronisation des cycles ovulatoires de la donneuse et de la receveuse est nécessaire et obtenue par des traitements hormonaux. Les embryons sont récupérés par un lavage de l'utérus.

On transfère souvent plusieurs embryons, 2 ou 3, et même quelques uns en plus qui possèdent beaucoup de fragments cytoplasmiques et qui sont dans l'impossibilité de faire un développement entier. Ceci donne des concentrations plus élevées de trophoblastine (IFN τ) qui est sécrétée par le trophoctoderme des embryons et favorise la nidation. Ce transfert peut s'effectuer par voie transcervicale ou par endoscopie (Bister, 1999).

CHAPITRE IV :

Les facteurs de croissance dans la FIVETE.

I. Dans la maturation in vitro.

Dans ce chapitre, je parlerai de ce qui fait réellement l'objet de mon mémoire : l'effet des facteurs de croissance sur la maturation ovocytaire et la fécondation in vitro (MIV et FIV respectivement). De nombreuses recherches ont déjà été menées sur le sujet. Dans ce qui suit, je donne une série de résultats qui en sont ressortis.

Les IGF possèdent des effets contradictoires suivant l'espèce considérée. Chez le lapin, l'IGF stimule le développement folliculaire, la production d'oestradiol et la maturation ovocytaire. Il agit via des récepteurs spécifiques situés sur la membrane ovarienne. Ceci est valable pour les cultures folliculaires in vitro (Yoshimoura et al., 1996). Chez le porc, le même facteur permet aux cellules du cumulus de se développer en réponse à un traitement à la FSH et il stimule la maturation nucléaire. C'est un composant du sérum fœtal bovin qui est utilisé lors des maturations in vitro (Singh et Armstrong, 1996 ; Balwant et Armstrong, 1997 ; Sirotkin et al., 1998). Chez le bovin, l'IGF-I n'a pas d'effet sur la MIV tandis que l'IGF-II la stimule.

L'EGF possède chez le bovin un effet stimulateur sur l'expansion du cumulus et sur la maturation méiotique. Cependant, il n'y a pas d'effet additif entre l'EGF et le sérum de veau fœtal (FCS). Ceci semble montrer que l'EGF est le principal facteur du FCS (Lorenzo et al., 1995 ; Lonergan et al., 1996). Chez le porc, il stimule la maturation nucléaire et cytoplasmique des ovocytes in vitro. Les effets de l'EGF sur la maturation ovocytaire sont influencés par les gonadotropines et autres substances présentes dans le fluide folliculaire (Uhm et al., 1998). Chez le lapin, différents résultats semblent indiquer qu'il existe des effets stéroïdiens dépendant de l'EGF sur la MIV. L'effet positif de l'EGF sur la MIV se retrouve aussi chez le chien (Russ et al., 1998). Chez le mouton, l'EGF favoriserait la maturation extra-ovocytaire (expansion de la corona radiata) mais serait incapable d'induire l'acquisition de la compétence de l'ovocyte (capacité d'être fécondé et d'atteindre un développement embryonnaire) (Y. Cognié, communication personnelle).

Le bFGF et le TGF β 1 sont essentiels chez les bovins pour la protéolyse extracellulaire au niveau de la matrice extracellulaire des COC. Ils vont permettre par leur action, la maturation extracytoplasmique avec l'expansion du cumulus (Bieser et al., 1998).

Le CSF-1, quant à lui, va induire un délai dans la maturation nucléaire chez le porc pour permettre une synchronisation avec la maturation cytoplasmique et augmenter ainsi les taux de fécondations ultérieurs (Tekpetey et al., 1996).

II. Dans la fécondation in vitro.

L'utilisation d'EGF dans le milieu de MIV augmente le taux d'ovocytes monospermiques après la fécondation in vitro chez le bovin (Im et Park, 1995). Par contre, chez le porc, l'EGF n'influence pas les taux de polyspermie et de pénétration des gamètes mâles.

L'ajout de CSF-1 dans le milieu de MIV permet une synchronisation des maturations nucléaire et cytoplasmique des ovocytes porcins, ce qui va en augmenter la fécondité (Tekpetey et al., 1996).

III. Dans le développement embryonnaire.

L'IGF-II et l'insuline possèdent un effet stimulateur sur le développement embryonnaire et augmentent la formation de blastocystes chez les bovins (Izadyar et al., 1996). L'IGF-I additionné à forte concentration à du sérum de vache et des cellules de granulosa peut augmenter le développement des embryons bovins produits in vitro (Palma et al., 1997).

L'EGF, quant à lui, n'a pas d'effets positifs sur le développement embryonnaire chez le bovin sauf pour les embryons cultivés seuls pour lesquels il va augmenter le taux de clivage lors du stade de huit cellules (Im et Park, 1995 ; Keefer et al., 1994 ; Rieger et al., 1998). Chez le porc, il a même tendance à diminuer le taux de formation de blastocystes.

Le TGF β 1 ne semble pas affecter le développement des blastocystes, le taux de clivage ou encore le nombre de cellules chez les bovins (Keefer et al., 1994). Le PDGF stimule le développement embryonnaire in vitro chez le lapin. Le TGF, le FGF et le PDGF augmentent chez les bovins le passage du stade morula au stade blastula (Lim et al., 1996).

IV. Chez le mouton.

Très peu de données sur l'influence des GF dans les processus de maturation, fécondation et développement embryonnaire in vitro sont disponibles chez le mouton.

C'est pourquoi le laboratoire de physiologie animale s'attache à les étudier en collaboration avec d'autres laboratoires.

Deuxième partie :

Matériel,

Méthode et Mise

au point

personnelle

CHAPITRE I :**Matériel et méthodes.**

Les expériences réalisées lors de ce mémoire ont été effectuées au laboratoire de physiologie animale, du département de médecine vétérinaire des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix de Namur.

Les ovocytes utilisés ont été prélevés sur des brebis tuées à l'abattoir d'Anderlecht ; quant au sperme, il provient du CISO (Centre d'Insémination et de Sélection Ovines) de Faulx-Les-Tombes.

I. Maturation in vitro.**1. Synthèse des différents milieux.**

Les différents produits ayant servis pour les essais de maturation in vitro et les quantités utilisées dans le milieu de récolte et de lavage (tableau 2) et dans le milieu de maturation (tableau 3) sont donnés dans les tableau 1 à 3.

Tableau 1 : Liste des produits utilisés et de leurs références.

Nom du produit :	Référence :
Chlorure de sodium (NaCl)	Vel 1723
EGF humain recombinant	Biosource PHG0064 (USA)
Fluide folliculaire	Venant d'ovaires de l'abattoir
FSH ovine (o-FSH)	NIH NIAmDD-oFSH-RP-1
Gentamycine	Sigma G-1272
Héparine	Leo (5000 UI/ml)

HEPES (N-[2-Hydroxyéthyl]piperazine-N'-[2ethanesulfonic acid])	Sigma H-6147
Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO ₃)	Merck 4936
IGF-I humain recombinant	Biosource PHG0074 (USA)
Milieu de culture tissulaire 199 (TCM 199) liquide et	BioWhittaker BE12-117F
Milieu de culture tissulaire 199 (TCM 199) lyophilisé	GibcoBRL 20011-037
TNF α humain recombinant	Biosource PHC3015 (USA)

Tableau 2 : Composition du milieu de récolte.

Nom du produit	Quantité (pour 1 litre de solution)
Milieu de culture tissulaire 199 (TCM 199, lyophilisé)	9,820 g
Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO ₃)	2,200 g
HEPES	2,283 g
Gentamycine (10 %)	4 ml
Héparine (5000 UI/ml)	2 ml

Le milieu de lavage a la même composition exception faite qu'il ne contient pas d'héparine.

Tableau 3 : Composition du milieu de maturation.

Nom du produit	Quantité (pour 1 litre de solution)
TCM 199, lyophilisé	9,820 g
Hydrogénocarbonate de sodium	2,200 g
o-FSH	5 μ g
Fluide folliculaire	10 %

Ces trois milieux ont d'abord été préparés avec du TCM 199 lyophilisé puis avec du milieu liquide. Dans le premier cas les milieux étaient préparés avec de l'eau milliQ (aimablement fournie par le laboratoire de Biologie Moléculaire Structurale), avec le milieu liquide on n'ajoutait pas d'HEPES (déjà présent dans le liquide), mais dans les deux cas le pH était ajusté à 7,3 pour tous les milieux. Ceux-ci étaient préparés la veille de leur utilisation et mis dans l'étuve à 39°C (avec CO₂ 5 % et H.R. de 95 %) (Heto lab Equipment Cellhouse 200)

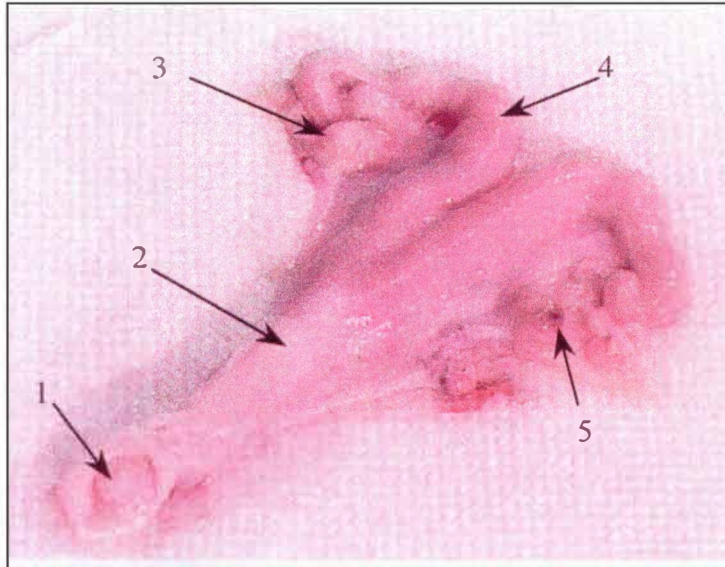


Figure 1 : Photographie d'une partie du tractus génital d'une brebis.

- 1 : col de l'utérus,
- 2 : corps de l'utérus,
- 3 : ovaire,
- 4 : corne utérine,
- 5 : corps jaune.

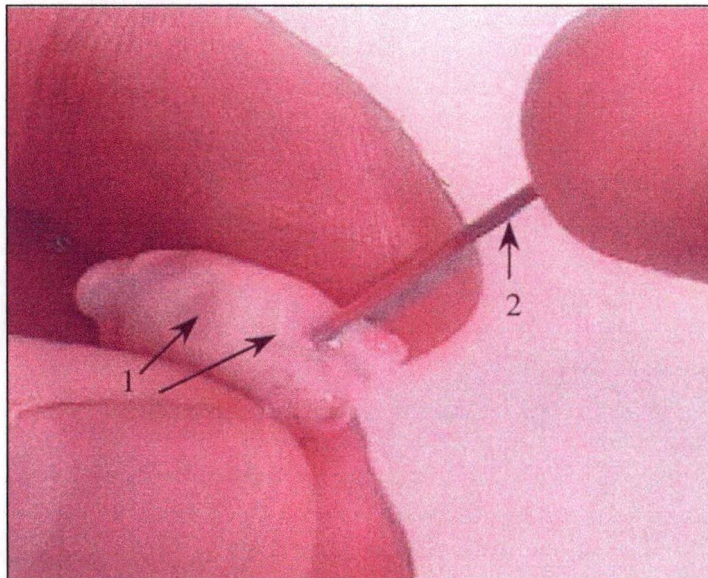


Figure 2 : Ponction des ovocytes.

- 1 : « taches » indiquant la présence de follicules,
- 2 : aiguille de ponction.

pour permettre une équilibration entre le CO₂ dissous (sous forme d'hydrogénocarbonate) et le CO₂ de l'air. Cet équilibre, avec le taux constant de CO₂ dans l'air, va permettre de tamponner le milieu et de le maintenir à un pH constant. Toutes les solutions utilisées sont filtrées avec des filtres millipores de 0,22 µm (pour le diamètre des pores) (MILLEX®-GP SLGPR25KS) pour les rendre stériles. *Rem.* : une stérilité relative vu que ces filtres ne laissent pas passer les bactéries mais bien les virus. Toutefois ils restent le seul moyen de stériliser les milieux puisqu'on ne peut pas les chauffer (dénaturation protéique des milieux).

2. Récolte des ovocytes.

Les ovaires sont récupérés à l'abattoir d'Anderlecht, dans les minutes qui suivent la mort des brebis (*figure 1*). Ils sont alors directement placés dans un récipient contenant du liquide physiologique (NaCl à 9 g par litre d'eau distillée) à 39°C. Ce même récipient est lui-même placé dans une boîte en frigolite avec de l'eau à 39°C pour garantir une température constante pour l'ensemble. Cette eau est changée ou ramenée à bonne température régulièrement pour garder cette température de 39 °C la plus constante possible. Une fois un quota de 50-70 ovaires atteint (dû à une limitation du temps à l'abattoir de 1 h voire 1 h 30 maximum), ceux-ci sont ramenés à Namur le plus rapidement possible. Le facteur temps reste très important pour la qualité des ovocytes.

Les ovaires sont alors lavés deux fois dans du liquide physiologique à 39 °C et sont gardés à cette même température dans cette solution physiologique au bain marie. Les follicules de 2 à 10 mm de diamètre sont ensuite ponctionnés (*figure 2*) grâce à la pompe à vide schématisée à la *figure 3*. L'aiguille de ponction de 18G1/2 (Seringue 18G1/2, Terumo 40-12) est introduite dans le follicule et est manipulée de façon à « racler » le follicule. L'aspiration utilisée est d'environ 25 mm Hg. On aspire ainsi tout le contenu du follicule; le fluide folliculaire et le COC (Complexe Ovocyte-Cumulus) qui transitent par un tuyau d'une dizaine de centimètres pour se retrouver dans un tube en verre (Venoject Terumo) contenant du milieu de récolte. Il est important d'éviter les irrégularités dans le tube reliant l'aiguille à l'éprouvette. Afin de limiter un maximum les « turbulences » qui risqueraient de dénuder les ovocytes. Après la ponction de 2-3 ovaires, la tuyauterie est rincée par aspiration d'une petite quantité de milieu de récolte, ce qui permet de récupérer les COC qui ont tendance à coller dans le tuyau suite à la formation de fibrine. En général, on obtient ainsi pour 60 ovaires trois tubes de 10 ml remplis d'un mélange de fluide folliculaire et de milieu de récolte.

3. Traitement et mise en maturation des ovocytes.

3.1. Les différents milieux de maturation.

A partir du milieu de maturation de base, on peut tester l'effet des facteurs de croissance. En effet, on sait que le fluide folliculaire ajouté dans le milieu de maturation est surtout utilisé pour sa richesse en facteurs de croissance. Seulement, l'utilisation d'un milieu non défini implique des variations dans sa composition et aussi des problèmes de stérilité ou de présence d'une substance inadéquate. Il serait donc intéressant de mettre au point un milieu défini pouvant remplacer le fluide folliculaire, d'où l'étude de l'effet des facteurs de croissance.

Un essai pour un facteur de croissance va comprendre un test négatif (-), un test positif (+), un test avec le facteur de croissance (GF) et enfin un même test avec en plus du fluide folliculaire (GF+FF). Le test négatif est un essai de maturation ovocytaire avec du milieu de maturation classique sans fluide folliculaire, contrairement au test positif qui en contient. Le test GF est mené avec du milieu de maturation classique sans fluide folliculaire mais additionné du facteur de croissance en question à une concentration de 10 ng par ml en général (dose physiologique). Ceci va permettre de voir si le facteur de croissance est capable de remplacer le fluide folliculaire. Pour vérifier si ce facteur se trouve ou non dans le fluide folliculaire, on effectue un quatrième test avec le facteur de croissance et le fluide folliculaire. Si l'effet reste inchangé par rapport à celui du facteur de croissance seul, on dira qu'il n'a pas d'effet additif entre le fluide folliculaire et le facteur de croissance, ce qui est une indication de la présence probable du facteur de croissance ou d'une molécule apparentée en quantité importante dans le fluide folliculaire.

Lorsqu'on teste plusieurs facteurs de croissance, un test positif et un test négatif suffisent pour l'ensemble des tests. Pour une meilleure comparaison des résultats, il vaut mieux utiliser toujours les mêmes produits et en particulier pour le fluide folliculaire (qui provient d'un même pool d'ovaires). De même, on utilisera toujours des volumes identiques de milieu de maturation par puits (ici 200 μ l) (plaques à quatre puits), avec un nombre plus ou moins d'ovocytes par puits (généralement 10).

3.2. Traitement et mise en maturation des ovocytes.

Les tubes de récolte sont gardés au chaud dans le bain marie à 39 °C. Ils vont être vidés, un par un, dans une boîte de pétri quadrillée de 9 cm de diamètre (*figure 4*). On récupérera les ovocytes d'un tube à la fois. Cette opération et celles qui suivent sont toujours effectuées sur une plaque chauffante maintenue à 39 °C qui est mise sous la hotte à flux laminaire (hotte à flux laminaire horizontal Holten LaminAir) pour garantir la stérilité. Le binoculaire placé sous la hotte est aussi muni d'une plaque chauffante. Les différentes manipulations des ovocytes sont effectuées sous la hotte dans des conditions de stérilité maximum, toujours à 39 °C, et avec une seringue Hamilton de 10 μ l munie d'une unopette

(capillaire en verre) préalablement autoclavée. On évitera une utilisation trop importante de l'éthanol (désinfection des mains, des ustensiles...) car les ovocytes sont relativement sensibles à une présence de celui-ci, même minime (communication personnelle de Bister et Gaspard).

Les COC sont ainsi récupérés, déposés dans le milieu de lavage et transférés successivement dans quatre puits de lavage (contenant 400 µl de milieu de lavage par puits) pour les isoler des amas cellulaires et autres débris qui se trouvent dans le milieu de récolte (*figure 5*). Ceci va également permettre d'éliminer un maximum de contaminations et d'empêcher la prolifération bactérienne grâce à la présence de gentamycine dans le milieu.

Enfin, les COC avec un cumulus constitué d'au moins deux couches de cellules mais sans masse granuleuse importante (*figure 6*) sont mis dans des puits contenant les milieux de maturation (200 µl de milieu par puits). Sauf pour les essais initiaux de mise au point ou quand nous avons un nombre anormal d'ovocytes (dû au nombre de brebis sacrifiées ces semaines-là), nous avons chaque fois mis 10 ovocytes par puits. Les boîtes de pétri sont alors placées pour 24 heures dans l'étuve à CO₂. Celle-ci est chauffée à 39 °C, avec une humidité relative d'environ 95 % et un pourcentage de CO₂ de 5 %.

II. Récolte, conditionnement et capacitation des spermatozoïdes.

1. Les différents milieux utilisés.

Les tableaux 4 à 7 donnent la liste des produits utilisés (tableau 4), la composition du dilueur de sperme de bouc et de bélier (tableau 5), du milieu de capacitation DMH (tableau 6) et du milieu SPM (tableau 7).

Tableau 4 : Liste des produits utilisés pour la dilution et la capacitation du sperme.

Nom du produit	Référence
Acide ascorbique	Vel 4074
Albumine bovine sérique (BSA)	Merck 1.12018.0100
Carbonate de calcium	Vel 1223
Chlorure de calcium bihydraté (CaCl ₂ .2H ₂ O)	Vel 1226
Chlorure de magnésium (MgCl ₂ .6 H ₂ O)	Merck 5833
Chlorure de potassium (KCl)	Merck 4936
Chlorure de sodium (NaCl)	Vel 1723
D(+)- Dextrose anhydre	Vel-UCB 1290

Dihydrogénophosphate de sodium (NaH ₂ PO ₄ .2 H ₂ O)	Vel 1769
Dihydrogénophosphate de sodium (NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O)	Merck 6346
Gentamycine	Sigma G-1272
Hyaluronidase	Sigma H-3506
HEPES	Sigma H-6147
Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO ₃ .H ₂ O)	Merck 6329
Inositol	Vel 7809
Lactate de calcium pentahydraté	UCB 551
Lévulose	Vel 1427
Monohydrogénophosphate de magnésium (MgHPO ₄ .3H ₂ O)	Sigma M-1265
Monohydrogénophosphate de sodium (NaHPO ₄)	Vel 1770
Pyruvate de sodium	Sigma P-4562
Rouge phénol	Sigma P-0290
Sérum de brebis en chaleur	Brebis en chaleur CRO
d-α-tocophérol	Sigma T-3634

Tableau 5 : Composition du DBB (dilueur de sperme bouc, bélier)

Nom du produit	Quantité (pour 1 litre de solution)
Acide ascorbique	0,050 g
Carbonate de calcium (CaCO ₃)	0,070 g
Dihydrogénophosphate de sodium (NaH ₂ PO ₄ .2 H ₂ O)	0,650 g
Gentamycine	2 ml
HEPES	11,900 g
Inositol	11,200 g
Monohydrogénophosphate de magnésium (MgHPO ₄ .3H ₂ O)	0,140 g
Monohydrogénophosphate de sodium (NaHPO ₄)	6,500 g
Lévulose	11,200 g
Phénol rouge	2 ml
d-α-tocophérol	5 µl

Ce dilueur est le fruit d'une recherche effectuée au laboratoire de physiologie animale et permet la conservation d'un sperme motile pendant plusieurs jours à 4 °C.

Il est possible de congeler les spermatozoïdes afin de les conserver durant une longue période (en théorie, perpétuellement). Pour cela, il convient de rajouter au DBB, 20 % de jaune d'œuf et 10 % de glycérol comme cryoprotecteur.

Tableau 6 : Composition du milieu de capacitation ou DMH (pour Defined Médium with HEPES).

Nom du produit	Quantité (pour 1 litre de solution)
Albumine bovine sérique (BSA)	4,000 g
Chlorure de calcium ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,330 g
Chlorure de magnésium ($\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$)	0,106 g
Chlorure de potassium (KCl)	0,300 g
Chlorure de sodium (NaCl)	7,570 g
Dextrose anhydre (glucose)	2,500 g
Dihydrogénophosphate de sodium ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0,113 g
HEPES	2,383 g
Hydrogénocarbonate de sodium ($\text{NaHCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0,350 g
Pyruvate de sodium	0,137 g
Sérum de brebis en chaleur	20 %

Ce milieu est réalisé avec de l'eau milliQ. Une fois réalisé, il peut se conserver pendant 2 à 3 semaines à 4 °C. Le sérum de brebis en chaleur est préalablement décomplémenté durant 1 heure à 56 °C et filtré pour éliminer toute une série de protéines (les peptides comme les facteurs de croissance sont suffisamment résistants pour passer cette étape). Le milieu est ajusté à pH 7,3.

Tableau 7 : Composition du milieu SPM

Nom du produit	Quantité
Pyruvate de sodium	<i>Ce milieu est vendu préparé (MediCult®) ; sa composition exacte n'est pas divulgué.</i>
Sérum synthétique de remplacement	
HEPES	
Bicarbonate de sodium	
Albumine de sérum humain	
Pénicilline (50.000 IU/litre)	
Streptomycine (50 mg/litre)	
Rouge de phénol	

2. Récolte et conditionnement du sperme.

Le sperme est récolté au CISO de Faulx-les-Tombes. On utilise la technique du vagin artificiel en veillant à tout moment à ne donner aucun choc, thermique ou osmotique, aux spermatozoïdes. La qualité de la semence est ensuite évaluée : volume, numération des spermatozoïdes (spectrophotomètre à 500 nm ou sur cellule de Burkner), proportion de morts, motilité... La semence est alors diluée avec du DBB jusqu'à une concentration de spermatozoïdes de 1.6 milliard par ml. Elle peut être conservée au frigo à 4 °C plusieurs jours. On peut aussi la stocker en la congelant dans de l'azote liquide après l'avoir conditionné en paillette de 0,25 ml. La dilution est alors de 10^8 spermatozoïdes / ml et le DBB est additionné de 20 % de jaune d'œuf (contenant des phospholipides) et de 10 % de glycérol. Ces molécules stabilisent les membranes et provoquent une déshydratation des cellules empêchant la formation de cristaux de glace. Après différentes étapes de refroidissement progressif, les paillettes sont plongées dans l'azote liquide à -196 °C.

3. Traitement et capacitation des spermatozoïdes.

Dans notre cas nous avons utilisé du sperme congelé ; pour la décongélation on plonge la paillette dans un bain marie à 39 °C pendant une minute. La capacitation du sperme congelé dure une heure. Différentes techniques de capacitation peuvent être utilisées ; elles commencent dès le premier traitement du sperme car celui-ci est dilué rapidement dans le milieu de capacitation.

Pour le sperme congelé, étant donné qu'on a une proportion de spermatozoïdes morts de 50 %, il est intéressant de pouvoir séparer ces morts des vivants. On peut y arriver par centrifugation (centrifugeuse, Beckman Model j-6 centrifuge) sur un gradient de percoll ou swim-up. D'autre part, si on veut utiliser du sperme frais, qui contient 95 à 100% de spermatozoïdes vivants, il suffit de séparer les spermatozoïdes du dilueur et du liquide séminal, qui contient des facteurs de décapacitation, pour permettre une capacitation. On procède donc à une ou plusieurs centrifugations pour laver les spermatozoïdes.

3.1. Centrifugation sur gradient de percoll.

La centrifugation du sperme déposé sur un gradient de percoll permet théoriquement une séparation entre les spermatozoïdes vivants et les morts sur base de la densité. Elle est basée sur une différence (inexpliquée) de densité entre les vivants et les morts. On réalise donc un gradient à deux niveaux de percoll dilué dans du milieu de capacitation. Du percoll à 45 % est placé dans un tube conique et ensuite, à l'aide d'une pipette pasteur, on met le percoll à 90 % sous celui à 45 %. Pour mieux visualiser le gradient, on peut ajouter une goutte de phénol rouge dans le niveau à 45 %. Après avoir déposé la semence au-dessus du gradient, on centrifuge 20 minutes à 2000 RPM. Les spermatozoïdes vivants, plus denses que les morts, se situent en majorité dans le culot tandis que les morts restent à l'interface des deux niveaux de percoll. Le dilueur, quant à lui, reste en surface. Les spermatozoïdes vivants sont récupérés, lavés avec du milieu de capacitation, centrifugés 20 minutes à 2500 RPM et le culot est resuspendu dans le milieu de capacitation. Après environ une heure, les spermatozoïdes sont capités (leur motilité a très fortement augmenté). Cette méthode est celle utilisée dans la littérature, par le laboratoire de l'INRA (en France) et par mon prédécesseur, Olivier Gaspard. On verra, dans ma mise au point personnelle (voir le chapitre II), que cette méthode a des inconvénients et a nécessité des modifications.

3.2. Centrifugation sur gradient de PureSperm®.

Cette technique est semblable à celle sur gradient de percoll. Le PureSperm® est une substance proche du percoll (dont la composition n'est pas donnée) fabriquée en Suède. Il nous a été donné par Olivier Gaspard qui travaille en fécondation humaine à Woluwé. On effectue un gradient à 3 niveaux. Le premier, à 90 %, en dessous, le deuxième, à 70 %, au milieu et le dernier, à 40 %, au dessus. Ces niveaux sont placés dans un tube conique comme pour le gradient de percoll c'est-à-dire en commençant par le plus faible et en mettant à chaque fois le plus concentré au dessous. Après avoir disposé la semence sur le gradient on centrifuge à 800 RPM pendant 5 minutes. Puis on recentrifugera, à 600 RPM pendant 4 minutes dans 4 ml de milieu de capacitation, pour terminer le lavage de la semence.

3.3. Le « swim-up ».

La technique du swim-up permet une sélection des spermatozoïdes en fonction de leur motilité. On procède donc à une centrifugation de la semence additionnée de milieu de capacitation (5 minutes à 1000 RPM) (*figure 7*) et, après avoir enlevé le surnageant, on rajoute délicatement du milieu de capacitation sur le culot sans le resuspendre. Les gamètes les plus mobiles vont remonter dans celui-ci et se capaciter. On pourra alors récupérer le surnageant et l'utiliser pour les fécondations. On peut éventuellement reconcentrer ensuite les spermatozoïdes par une petite centrifugation et une resuspension du culot dans un plus petit volume.

3.4. Centrifugations de lavage du sperme frais.

Le sperme frais ne contenant pratiquement que des spermatozoïdes vivants, les techniques précédentes deviennent inutiles pour la capacitation. La seule chose à faire est de séparer les gamètes du dilueur, ainsi que du liquide séminal qui contient des facteurs de décapacitation. On procède alors à une dilution avec du milieu de capacitation éventuellement additionné de gentamycine (400 mg par litre) suivie d'une centrifugation (5 minutes à 2000 RPM) qui est plus importante que pour le sperme congelé. En effet, dans le sperme frais, les spermatozoïdes ne sont pas déshydratés et donc sont moins denses et sédimentent moins vite. Plusieurs lavages successifs peuvent être effectués, tout en sachant que trop de centrifugations risquent d'altérer la viabilité des spermatozoïdes.

Ces différentes techniques (les deux gradients et le swim-up) sont décrites ici sous leur forme initiale c'est-à-dire comme on me les a proposées au début de mon travail. Une mise au point personnelle sera décrite au chapitre suivant.

III. Fécondation in vitro.

1. Le milieu utilisé.

Le tableau 8 montre la composition du milieu de fécondation.

Tableau 8 : Composition du milieu de fécondation.

Nom du produit	Quantité (pour 1 litre de solution)
DMH	1 L
Lactate de calcium	1,800 g

Le pH de ce milieu est ajusté à 7,7. Celui-ci sera disposé dans des puits pour le lavage (400 μ l) et la fécondation (200 μ l) des COC maturés. Ce milieu s'avérera mauvais au cours des différentes expériences (détails au chapitre II).

2. Fécondation.

La maturation in vitro des COC se réalise en 24 heures (*figure 8*). Elle est observable grâce à l'expansion du cumulus, signe de la maturation extraovocytaire. L'expulsion du premier globule polaire est rarement observée, celui-ci ayant une existence très fugace.

Les COC sont lavés dans plusieurs bains de milieu de fécondation avant d'être mis dans le milieu de fécondation définitif.

Les spermatozoïdes, après capacitation, sont comptés sur cellule de Burkner et dilués jusqu'à une concentration de 10 millions par ml. Cent microlitres de semence sont alors ajoutés aux ovocytes dans le milieu de fécondation (*figure 9*). Le tout est laissé 17 à 18 h dans l'étuve à CO₂ après quoi les ovocytes (éventuellement devenus œufs) sont mis en développement embryonnaire ou sont fixés pour l'observation des pronuclei.

Au cours de cette manipulation, les COC perdent la majorité des cellules du cumulus. Aucun traitement particulier n'est ajouté (pipettes effilées calibrées, protéases,...) pour éliminer ces cellules.

IV. Observation des zygotes.

1. Liste des produits utilisés.

Ce que nous avons utilisé comme substances se retrouve dans le tableau 9.

Tableau 9 : Liste des produits utilisés et de leurs références.

Nom du produit	référence
Acide acétique (99-100 %)	Vel 1005
Chlorure de sodium (NaCl)	Vel 1723
Citrate trisodique	CARLO ERBA 368057
Ethanol absolu	Vel 1115
Fluorochrome (bisbenzimidazole)	Hoechst 33342

2. Méthodes d'observation.

2.1. Sans coloration.

Les zygotes peuvent être observés après une fixation dans une solution d'éthanol-acide acétique (3 : 1). On débarrasse au préalable les œufs de leur cumulus en les plongeant dans du liquide physiologique additionné de hyaluronidase (100 unités par ml de liquide). Différents lavages successifs les débarrassent des cellules du cumulus qui resteraient encore. Ces lavages permettent aussi d'éliminer les protéines du milieu de fécondation qui précipiteraient au contact de l'éthanol. En effet, après ces lavages les œufs sont plongés dans le mélange éthanol/acide acétique, ils sont alors fixés.

Les zygotes sont observés au binoculaire ou au microscope : le cytoplasme étant devenu transparent, il est possible de distinguer les ovocytes non fécondés (où l'on voit encore la plaque métaphasique ou un seul pronucléi), les œufs fécondés (avec deux pronucléi ; *figure 10*) et les œufs polyspermiques (avec plus de deux pronucléi). Cette technique convient aussi pour faciliter l'observation des ovocytes et embryons (qui sont de toute façon directement observables).

2.2. Coloration au fluorochrome de Hoechst.

Le fluorochrome de Hoechst 33342 a la propriété de se fixer sur les chromosomes. Les zygotes sont disposés sur une lame de microscope, séchés pendant une demi heure et plongé pour 24 heures dans une solution d'éthanol à 70 %. On prépare ensuite une solution de citrate trisodique dans laquelle on a rajouté 1 % de solution de Hoechst à 1 mg par ml d'eau. La lame est ensuite séchée et additionnée de 20 µl de la solution à 1 % de Hoechst (1mg/ml H₂O) dans du citrate trisodique (2,3 % dans de l'eau). Une lame couvre-objet est scellée avec du vernis. L'observation se fait en épifluorescence (filtre BP 340-380 nm et filtre LP 430 nm)⁽¹⁾. Les lames se conservent à 4 °C en chambre noire.

V. Analyse des résultats.

1. Résultats des maturations.

Les maturations ovocytaires (MIV) peuvent être exprimées par un taux de maturation c'est-à-dire le rapport du nombre d'ovocytes maturés sur le nombre d'ovocytes mis en culture. Ce taux de maturation ou taux de réussite (T.R. de maturation) sera exprimé en pour cent.

⁽¹⁾ Je tiens à remercier le laboratoire du professeur Y. Poumay pour m'avoir permis d'utiliser leur microscope à fluorescence.

Après les essais préliminaires dans nos expériences, nous avons toujours maintenu les mêmes conditions c'est-à-dire le même fluide folliculaire (venant d'un seul pool de follicules) et les mêmes solutions de facteurs de croissance (venant d'une même solution ensuite aliquotée). D'autre part, les COC étaient généralement au nombre de 10 par puits.

Toutes ces précautions permettent d'avoir des résultats comparables les uns aux autres statistiquement.

Pour les maturations, 9 expériences probantes sont utilisables pour l'étude statistique. Ainsi, nous avons à chaque fois un test négatif (sans fluide folliculaire), un test positif (avec FF), trois tests avec les différents facteurs de croissance (IGF-I, EGF et $TNF\alpha$) sans FF, et les trois mêmes avec FF. On peut donc réaliser un tableau à deux entrées avec 4 colonnes pour les quatre tests et avec deux lignes pour la présence ou l'absence de FF.

Ce tableau peut servir alors à une analyse statistique par test ANOVA 2 (Analyse de la Variance à deux critères de classification). Les deux critères sont le GF (critère « a » qui possède 4 niveaux) et la présence ou l'absence de FF (critère « b » qui possède 2 niveaux). La répétition de la mesure (k) est égale à 9. Le test ANOVA 2 est réalisé après le test de Hartley qui permet de dire si deux échantillons ont des variances homogènes et donc s'ils sont comparables entre eux.

Ce test ne donne cependant pas beaucoup d'informations. Par exemple, on pourra dire qu'il y a un effet des facteurs de croissance, mais on ne pourra préciser lesquels. Il est dès lors intéressant de faire des comparaisons de moyenne 2 à 2 pour affiner nos conclusions. Ceci est permis par les contrastes de Scheffé. Ces contrastes vont permettre de comparer la différence entre deux moyennes (des critères que l'on veut comparer) à une moyenne « calculée » que l'on appelle PPDS (Plus Petite Différence Significative).

Ces contrastes n'étant pas assez puissants, nous avons utilisé des contrastes orthogonaux pour voir si nous pouvons ou non tenir compte de ces résultats et affiner au maximum nos conclusions.

2. Résultats des fécondations.

Malheureusement nous n'avons pas eu suffisamment de fécondations pour pouvoir les analyser statistiquement. De plus nous ne sommes pas sûrs qu'il s'agisse de réelles fécondations. En effet, l'observation par simple fixation n'a rien donné (observation au microscope photonique simple) et l'observation en épifluorescence avec le fluorochrome de Hoechst n'a pas donné de résultats fort probants. Nous discuterons du problème dans le chapitre suivant ainsi que dans la discussion des résultats.

CHAPITRE II :

MISE AU POINT PERSONNELLE

Le temps pris pour réaliser ce mémoire est dû aux nombreux tests pour mettre au point aussi bien la maturation que la capacitation ou encore la fécondation. Nous avons aussi dû attendre longtemps (un mois et demi) pour recevoir le TNF, or il est nécessaire pour des raisons d'interprétation statistique que les tests avec les différents facteurs de croissance se fassent dans les mêmes conditions donc en même temps. D'autre part les expériences ne pouvant se faire qu'une fois par semaine (il n'y a qu'un abattage de brebis de cette importance par semaine à Anderlecht), la moindre contamination stoppe toute l'expérience.

I. Récupération des ovocytes.

1. De l'abattoir au laboratoire.

Dans le but de récupérer des ovaires de « bonne qualité » il était nécessaire de maintenir ceux-ci à 39 °C (qui est la température corporelle de la brebis donc la température optimale) et dans du liquide physiologique. Les ovaires étaient placés dans des récipients contenant ce liquide physiologique eux-même placés dans une boîte de polystyrène expansé remplie d'eau. Pour garantir une température la plus constante possible, cette eau était contrôlée environ toutes les 20 minutes. L'idéal serait de disposer d'une boîte comme celle-ci mais comprenant un thermostat et une résistance chauffante qui permettrait une meilleure stabilité de température (ce genre de dispositif existe mais est onéreux). Le contrôle de la température durant les expériences reste difficile vu le nombre de fois que l'on manipule les ovocytes (l'idéal serait ici encore d'avoir une pièce entière à 39 °C !).

Pour éviter une trop grande proportion d'ovocytes dégénérés, le temps passé à l'abattoir a été limité à 1 h – 1 h 30 afin de travailler avec le matériel biologique le plus frais possible.

2. Ponction des follicules.

Le taux normal de récupération (Tr) des ovocytes est de 1,5 par ovaire. Pour commencer, le Tr n'était que de 0,7, ce qui n'était pas suffisant pour disposer du nombre d'ovocytes nécessaires pour tester simultanément les trois facteurs de croissance.

Le problème de cette faible récupération a été résolu par l'ajustement de la force d'aspiration. Le Tr est passé à 1.5 lorsque la dépression a été augmentée à 25 mm Hg tout en gardant une proportion d'ovocytes nus (c'est-à-dire sans cellules du cumulus) de 30 % dans un cas comme dans l'autre. Au delà de 25 mm de Hg, la proportion de nus dépasse 30 % (ces ovocytes ne pouvant mûrir sans leurs cellules du cumulus sont donc inutiles). Les 30 % restent quand même une grande proportion, compensée par un Tr plus élevé.

Pour éviter les ovocytes dégénérés il était nécessaire de rincer la tuyauterie de ponction (entre l'aiguille de ponction et le tube à essais de récolte).

Quelques améliorations apportées lors des différentes ponctions ont permis de passer à un Tr de 2.5 tout en gardant une pression de 25 mm Hg et une proportion de nus de 30 %.

La première fut d'éviter les « turbulences » dans la tuyauterie c'est-à-dire de rendre le chemin que parcourent les ovocytes le plus droit et le plus court possible. Ceci permet aux ovocytes de passer sans s'accrocher à la tuyauterie et sans y perdre les cellules du cumulus ou y rester et subir une dégénérescence les rendant alors inutilisables.

La deuxième consistait à augmenter la fréquence des rinçages de la tuyauterie, qui est passée de tous les 5 ovaires à tous les 2 ovaires ponctionnés. Ceci a permis de diminuer la coagulation des ovocytes avec les différents composants du fluide folliculaire.

La suivante a eu le même effet. Elle consiste à ajouter 0,2 ml d'héparine par tube et de ponctionner un maximum de 20 ovaires par tube de récolte (d'une capacité de 10 ml).

Le principe de la dernière amélioration est d'exercer une légère pression sur l'ovaire au fur et à mesure de la ponction. Ceci paraît inutile mais lorsque l'on ponctionne l'ovaire il devient plus flasque et la ponction en devient malaisée.

Ces améliorations simples ont contribué à l'obtention d'un nombre suffisant de COC et à pouvoir choisir ceux qui ont conservé au mieux leur intégrité (au moins deux couches de cellules de cumulus continues autour de l'ovocyte, cytoplasme clair, pas de signe de dégénérescence ou de maturation spontanée,...) pour la mise en maturation.

II. Maturation des ovocytes.

Pour la mise au point de la maturation, nous avons bénéficié de l'expérience d'Olivier Gaspard. Toutefois, les maturations n'ont pas fonctionné au départ. Le problème a été résolu par l'augmentation de la concentration en FSH, 100 ng/ml au lieu de 25 ng/ml.

Le milieu de maturation n'a ensuite plus posé de problème et nous avons pu observer des maturations correctes (soit une bonne expansion des cellules du cumulus).

III. Capacitation des spermatozoïdes.

C'est le point qui a posé le plus de problèmes avec la fécondation. De nombreux tests ont dû être effectués pour mettre au point cette capacitation. La capacitation d'un spermatozoïde est indispensable pour l'acquisition du pouvoir fécondant grâce au démasquage des récepteurs membranaires reconnaissant la zone pellucide de l'ovocyte. In vivo, elle se fait par élimination du liquide séminal (contenant des substances décapacitantes) et grâce au liquide oviducal contenant des facteurs de capacitation (glycosaminoglycans, héparine,...).

Tous les tests réalisés sur le sperme ont été réalisés au moins trois fois afin d'avoir des résultats fiables.

1. Tests préliminaires pour le traitement et la capacitation des spermatozoïdes.

Avant de réaliser la capacitation et puis la fécondation, il est nécessaire d'établir si la semence congelée est valable. Pour ce faire une série de tests a été réalisée sur le sperme congelé de différents béliers. Nous avons testé 3 béliers, Tertio (de race Texel), Viking (Texel aussi) et Allançon (de race Ile de France) tous venant du CISO à Faulx-les-Tombes. Les deux tests sont l'observation d'un mouvement massal (mouvement dans le sperme observable dès que la paillette est décongelée) et la coloration éosine/nigrosine (les vivants rejettent ces colorants vitaux tandis que les morts s'en imprègnent). Le test éosine/nigrosine permet une estimation du pourcentage de spermatozoïdes vivants par rapport aux total de spermatozoïdes (% V, dans le tableau, sachant que $\% V = (\text{Vivants}/\text{Total}) \times 100$). Le pourcentage normal pour du sperme congelé est de 50 % V. Les résultats se trouvent consignés dans le tableau 10.

Tableau 10 : résultats des tests sur les différents spermes.

Nom du bélier	Mouvement massal	Coloration Eosine/nigrosine % V
Allançon	Bon	40
Tertio	Très bon	55
Viking	Bon	50

Au vu de ces résultats, c'est le sperme de Tertio qui a été retenu pour les essais de capacitation et de fécondation.

2. Méthode du gradient de percoll.

Cette méthode permet (théoriquement) de séparer les spermatozoïdes vivants des morts. Elle se base sur une différence de densité inexpliquée qui existe entre les spermatozoïdes morts et vivants : les vivants sont un peu plus denses et vont donc se retrouver préférentiellement dans le culot tandis que les morts restent à l'interface des deux solutions de percoll (45 et 90 %). Le dilueur restant au-dessus du gradient.

En pratique, ce phénomène de séparation ne s'est pas vérifié. En effet, malgré les différents essais, tous les spermatozoïdes restaient à l'interface des deux concentrations de percoll. Même en augmentant la vitesse de centrifugation jusqu'à 2500 RPM (durant 20 minutes) les spermatozoïdes ne descendaient pas mieux. D'autre part, une augmentation trop grande de la vitesse altérerait les spermatozoïdes. C'est pourquoi cette méthode a, tout d'abord, été abandonnée au profit d'autres méthodes comme le « swim-up » et le gradient de PureSperm® puis remise à l'essai.

D'autres gradients de concentration ont été testés (tableau 11). Après essais, un volume de 2 ml a été choisi pour chaque concentration des gradients.

Tableau 11 :

Gradient réalisé	Efficacité pour la capacitation
80 et 40 %	Les spermatozoïdes ne passent pas
60 et 30 %	Toujours pas de culot
40 et 20 %	Culot, mais pas suffisant
30 et 10 %	Très bon culot, bonne motilité des spermatozoïdes
15 et 5 %	Culot trop tassé

A la suite de ces essais, c'est le gradient 30 et 10 % qui a été utilisé. Il est suivi d'une autre centrifugation, à 800 RPM pendant 5 minutes et dans 4 ml de milieu de capacitation pour éliminer le percoll.

La raison de cette modification apportée aux protocoles classiques provient, probablement, de la mise au point de nouvelles techniques de congélation de sperme effectuées au laboratoire et qui sont actuellement utilisée au centre d'insémination (CISO). La densité des spermatozoïdes est moins modifiée que lors des protocoles classiques et la concentration en percoll doit être diminuée pour discriminer les spermatozoïdes.

Les paramètres susceptibles de modifier la densité des spermatozoïdes sont l'osmolarité des dilueurs, le temps d'incubation dans ces dilueurs et la vitesse de congélation.

3. Gradient de PureSperm®.

Le PureSperm® est une substance semblable au percoll, utilisée en médecine humaine. Ce gradient n'est pas double mais triple, 90 %, 70 % et 40 %. On dépose la semence au dessus du gradient, elle est alors centrifugée à 800 RPM durant 5 minutes. Cette méthode ne nous a été communiquée que très tardivement. Toutefois cette technique reste la meilleure. Elle utilise un milieu différent, le SPM (Sperm Preparation Medium) favorable aussi à la capacitation (composition voir *Tableau 7*).

Pour ce gradient, la vitesse de 1000 RPM est préconisée pour des spermatozoïdes humain. Les tests se sont basés sur cette vitesse de rotation pour déterminer celle qui est optimale dans nos conditions.

Le tableau12 relate les tests effectués. Les paramètres de la centrifugation conservés pour nos essais a donc été 800 RPM pendant 5 minutes.

Tableau 12 : Tests effectués avec le PureSperm®.

Vitesse	Temps (minutes)	Commentaires
600	3	Culot absent
600	5	Culot trop lâche
800	3	Culot trop lâche
800	5	Bon culot
1000	3	Culot trop tassé
1000	5	Culot trop tassé
1200	3	Culot trop tassé
1200	5	Culot trop tassé

Malgré de bons résultats, ce gradient fut abandonné au profit du gradient de percoll (voir point précédant) pour deux raisons ; la première est que cette méthode nous a été communiquée tardivement, la deuxième est que le gradient de percoll utilise le milieu DMH qui a été montré comme le meilleur pour la survie des spermatozoïdes (voir tableau 13 page 56)

4. « Swim-up ».

Cette technique consiste à concentrer les spermatozoïdes en un culot, les couvrir de milieu de capacitation, et laisser les gamètes les plus vigoureux envahir cette solution. Malgré le test de différentes vitesses de centrifugation, cette méthode reste peu fiable et peu de spermatozoïdes vraiment capacités sont récupérés. La cause principale de cette perte vient du fait qu'une bonne partie des spermatozoïdes restent bloqués au fond du culot et ne peuvent pas remonter.

Une première centrifugation -(800 RPM, 5 minutes) du contenu de la paillette de sperme dilué dans 4 ml de milieu de capacitation- permet de laver les spermatozoïdes.

Après resuspension des gamètes, une seconde centrifugation est utilisée pour réaliser le swim-up. Les résultats de ces tests se trouvent dans le tableau 13.

Tableau 13 : Résultats des essais de « swim-up »

Vitesse (RPM)	Temps (minutes)	Résultats et commentaires
1000	4	Le culot est trop tassé et les spermatozoïdes restent bloqués dans le culot. La vitesse est trop grande.
1000	2	
800	4	Culot trop tassé. Temps trop long.
800	2	Bon culot mais le swim-up est mauvais.
600	4	Très bon culot, suffisamment lâche pour le swim-up.
600	2	
400	4	Culot beaucoup trop lâche et un grand nombre de spermatozoïdes restent dans le surnageant.
400	2	

Nous aurions pu essayer de déterminer la vitesse et le temps de centrifugation en utilisant la formule fondamentale de Svedberg. Ceci n'est pas possible vu que les différences entre les spermatozoïdes sont assez grandes, il est donc impossible de déterminer une méthode qui s'appliquerait à toutes les semences. En effet, divers éléments interviennent. Le premier est le fait que la composition de la semence varie d'un bélier à l'autre, ce qui change la manière de sédimenter. Le deuxième vient des spermatozoïdes qui ne sont pas tout à fait les

mêmes d'un bélier à l'autre. Troisièmement les spermatozoïdes ne se déshydratent pas tous de la même manière en présence d'éléments cryoprotecteurs.

Les meilleurs paramètres sont donc 600 RPM pendant 4 minutes.

En pratique, cette méthode s'est avérée la moins efficace donc nous ne l'avons plus utilisée. En effet, les spermatozoïdes se capacitaient moins par rapport aux autres méthodes, sédimentaient plus souvent qu'il ne « nageaient » et finalement le taux de récupération était insuffisant pour pratiquer la FIV.

IV. Fécondation.

1. Problématique.

Le principe de la méthode de fécondation est simple ; les spermatozoïdes capacités sont placés dans le milieu de fécondation contenant les ovocytes maturés. Cependant aucun résultats probant n'a pu être obtenu. En effet, à la suite de différentes méthodes d'observation seulement 2 ou 3 fécondations potentielles ont pu être observées, de plus celles-ci sont apparues tardivement au cours de l'expérimentation.

2. Discussion du problème.

Lorsque les problèmes de capacitation ont été résolus, les résultats de la FIV sont restés pratiquement nuls. Des recherches ont été entreprises afin d'en déterminer la raison, et il est apparu que la survie des spermatozoïdes dans le milieu de fécondation était fortement réduite.

Dés lors, ce milieu a été testé et différents paramètres vérifiés comme ; l'osmolarité, la stérilité, la concentration des divers composants et le pH. L'osmolarité était correcte (280-310 mOsm). Pour la stérilité et la concentration des différents éléments, les milieux ont été préparés par d'autres personnes, expérimentées, sans amélioration notable.

Il est apparu que le pH était seul en cause. Le pH du milieu ne se stabilisait pas à 7.3 dans l'étuve comme prévu. Le pH devenait rapidement trop acide, les spermatozoïdes ne survivaient pas longtemps dans ce milieu.

Le lactate de calcium du milieu fut suspecté de provoquer ce pH acide. En effet, le pH du DMH restait stable alors que celui du milieu de fécondation, qui consiste en DMH additionné de lactate (tableau 8), variait rapidement.

Différents milieux ont aussi été testés (tableau 13) à savoir, le SPM (Sperm Preparation Médium), le DMH (Defined Medium with Hepes), le milieu de fécondation et le DBB (Dilueur Bouc Bélier, du CISO). Une cote entre 1 et 5 caractérisant le mouvement des spermatozoïdes a été utilisée pour ces tests. Une cote de 1 correspond au mouvement que les spermatozoïdes avaient à la sortie de la paillette, tandis qu'une cote se rapprochant de 5 indique une diminution du mouvement jusqu'à l'arrêt (pour 5).

Tableau 13 : Test réalisé avec différents milieux.

Milieux	Temps après la mise des spermatozoïdes dans le milieu (min)												
	0	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360
SPM	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	3
DMH	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
M. Féc.	1	1	1	1	2	3	3	3	3	4	4	5	5
DBB	1	1	1	1	1	2	3	3	3	3	4	4	5

C'est le DMH qui convient le mieux à la survie des spermatozoïdes. C'est donc ce milieu qui a été utilisé pour la capacitation des spermatozoïdes et la fécondation. Ces tests ont tous été réalisés trois fois pour garantir des résultats rigoureux.

Malgré la résolution de ce problème, seulement deux fécondations ont pu être observées. Quelques hypothèses sur les raisons de cette absence de fécondation ainsi que des idées pour mieux observer les zygotes seront émises dans la discussion des résultats.

Troisième partie :

Résultats
expérimentaux

CHAPITRE I :

Résultats expérimentaux.

I. Les maturations.

I. Taux de maturation.

1.1. Rappels préliminaires.

Les expériences consistent à comparer les résultats des MIV effectuées dans un milieu de base (contrôle) ou contenant un facteur de croissance (IGF-I, EGF et $TNF\alpha$) et additionné (+ FF) ou non (- FF) de fluide folliculaire.

Au terme de la période des manipulations, 9 expériences réalisées dans des conditions standardisées ont été retenues pour l'analyse statistique. En effet, les expériences du début ne sont pas valables statistiquement, de plus celles-ci servaient uniquement à la mise au point de la technique. D'autres expériences pour lesquelles nous avons eu des contaminations ou un nombre d'ovocytes inférieur à dix par puits n'ont pas été prises en compte.

1.2. Résultats.

Pour la clarté de l'exposé, les résultats des 9 expériences sont rassemblés dans le tableau 1. Le résultat des maturations in vitro y est exprimé en pourcent bien que le nombre des ovocytes soit généralement de 10 (ou 15).

Tableau 1 : Résultats des maturations (T.M., le taux de maturation exprimé en %).

	T.M.			
	Milieu seul (M)	M + IGF	M + EGF	M + TNF
- FF	0	80	60	60
	10	80	100	70
	0	60	60	50
	10	60	40	70
	0	80	60	73
	0	60	60	40
	0	80	60	80
	0	70	70	40
	10	80	70	60
Moyenne ± écart-type	3.3 ± 5	72.2 ± 9.7	64.4 ± 15.9	60.3 ± 14.4
+ FF	60	50	70	80
	70	70	80	80
	80	60	60	60
	40	70	70	50
	93	73	87	73
	70	100	90	60
	80	70	100	90
	70	80	70	80
	80	60	60	70
Moyenne ± écart- type	71.4 ± 15	70.3 ± 14.2	76.3 ± 13.8	71.4 ± 12.7

N.B : Lors de l'expérience 5, 15 ovocytes étaient placés dans chaque puits, vu la grande quantité de follicules ponctionnés (177 ovocytes en comptant les ovocytes nus, soit 124 ovocytes avec cellules), ce qui explique les valeurs rapportées.

La *figure 1* représente les moyennes des résultats des 9 expériences. On peut y voir qu'en absence de fluide folliculaire ou de facteur de croissance la maturation est très faible. Après l'ajout de fluide folliculaire, on constate que le taux monte à 71 %. L'addition d'un facteur de croissance en absence de FF permet la maturation d'une certaine proportion de COC.

En absence de FF, c'est l'IGF-I qui donne les meilleurs résultats en donnant des taux de maturation proches de ceux obtenus avec le FF. L'EGF et le TNF donnent des résultats moindres mais restent toutefois assez bons (64 % et 60 % respectivement).

Le seul facteur qui posséderait un effet additif avec le FF est l'EGF, mais ce taux n'est peut-être pas significativement différent par rapport à celui obtenu avec le seul FF (76 et 71% respectivement). Ces résultats sont analysés statistiquement ci-après.

2. Analyse statistique.

Rem : Le détail de l'analyse statistique se trouve dans les annexes 1 et 2.

2.1. Présentation des analyses.

L'analyse statistique porte sur les résultats concentrés dans le tableau 1.

Pour rappel, dans le test de Hartley (test d'homogénéité des variances), AH0 signifie que l'on accepte l'hypothèse nulle, c'est à dire l'hypothèse selon laquelle les variances sont homogènes (d'où les échantillons seront comparables entre eux). C'est seulement dans ce cas que l'on peut continuer et réaliser le test par ANOVA. Un RHo signifie qu'il faut arrêter le test par ANOVA car on risquerait de tirer des conclusions erronées.

Dans le test ANOVA, AH0 signifie qu'il n'y a pas d'effets des critères fixés (GF, FF,...). Un RH0S et un RH0SS permettent de conclure qu'une différence significative existe entre deux valeurs du tableau sans pour autant pouvoir préciser lesquelles. On fixe pour cela des probabilités d'avoir raison qui sont respectivement de 0.95 et de 0.99.

En ce qui concerne les contrastes orthogonaux et de Scheffé, RH0S et RH0SS signifient qu'il existe une différence significative entre les deux moyennes considérées. Les probabilités sont aussi de 0.95 et de 0.99.

2.2. Analyses proprement dites.

2.2.1 Test de Hartley et ANOVA.

Il existe un effet hautement significatif des facteurs de croissance et du fluide folliculaire ainsi qu'une interaction hautement significative entre ces critères (tableau 2).

Tableau 2 : Résultats des tests de Hartley et ANOVA.

Test de Hartley	AH0
Test ANOVA 2 croisée fixe :	
Effet des GF	RH0SS
Effet du FF	RH0SS
Interaction	RH0SS

2.2.2. Contrastes «de Scheffé ».

Les moyennes des résultats ont été comparées 2 à 2 par des contrastes de Scheffé. Les résultats sont résumés dans les tableaux 3 et 4. Ils montrent que les différents facteurs de croissance (IGF-I, EGF et TNF) sans FF ont un effet hautement significatif. Par contre, on constate qu'il n'y a pas de différence significative entre les effets des différents facteurs de croissance (tableau 3).

Il n'y a pas d'effet supplémentaire des facteurs de croissance par rapport au milieu seul avec FF ni d'effets significativement différents entre ceux-ci (tableau 4).

Tableau 3 : Résultats des contrastes de Scheffé pour les conditions sans FF.

		Sans FF			
		Milieu seul	M + IGF-I	M + EGF	M + TNF α
Sans FF	Milieu seul	0			
	M + IGF	RH0SS	0		
	M + EGF	RH0SS	AH0	0	
	M + TNF	RH0SS	AH0	AH0	0

Tableau 4 : Résultats des contrastes de Scheffé pour les conditions avec FF.

		Avec FF			
		Milieu seul	M + IGF-I	M + EGF	M + TNF α
Avec FF	Milieu seul	0			
	M + IGF-I	AH0	0		
	M + EGF	AH0	AH0	0	
	M + TNF α	AH0	AH0	AH0	0

2.2.3. Contrastes orthogonaux.

Les contrastes de Scheffé n'étant pas assez puissants, il est préférable d'effectuer des contrastes orthogonaux qui confirment les résultats obtenus par contrastes de Scheffé.

Les tableaux 5 et 6 rendent compte des résultats de ces contrastes pour les conditions sans (tableau 5) et avec (tableau 6) FF. On se posera à chaque fois 3 questions :

- la première : y-a-t-il un effet des facteurs de croissance par rapport au milieu seul (sans ou avec FF).

- la deuxième : y a t il une différence entre l'IGF (qui apparaît comme le meilleur et avait déjà été prouvé comme tel par O. Gaspard dans les résultats de son mémoire) et l'EGF et TNF.
- la troisième : y a t il une différence entre l'EGF et le TNF.

Tableau 5 : Contrastes orthogonaux pour les conditions sans FF.

Questions :	Rejet / Acceptation (99 %)
Première	RH0
Deuxième	AH0
Troisième	AH0

Tableau 6 : Résultats des contrastes orthogonaux pour les conditions avec FF.

Questions :	Rejet / Acceptation (99 %)
Première	AH0
Deuxième	AH0
Troisième	AH0

Lorsque les milieux ne sont pas additionnés de FF, les GF ont un effet hautement significatif. Par contre il n'y a pas de différence significative entre les différents GF.

Mais lorsque du FF est ajouté aux milieux, les GF n'apportent aucune amélioration significative et ne montrent entre eux aucune différence significative.

Ces contrastes prouvent ce que nous avons déjà conclu avec les autres contrastes.

3. Conclusions.

D'après le mémoire d'Olivier Gaspard nous savions que le FF est indispensable. que sans FF la maturation n'est pas possible. Les 3 ovocytes dont nous avons observé une expansion du cumulus, dans du TCM 199 sans FF ni GH, avaient probablement déjà entamé leur maturation avant leur mise en culture.

Pour les GF, un effet significatif apparaît clairement sur la maturation et ce, même en l'absence de FF. Quand il n'y a pas de FF, c'est l'IGF-I qui apparaît comme le plus performant pour assurer la maturation, mais cette différence par rapport aux autres GF n'est pas significative.

Pour ce qui est des conditions où nous avons du FF et des GF, l'apport d'un de ces GF n'a pas apporté d'amélioration significative. Nous ne pouvons pas dire si cela est dû au fait que ce facteur est déjà présent dans le FF, au fait que ce facteur a un inhibiteur dans le FF ou s'il y a une perte de cette information due à la méthode d'analyse.

II. Fécondation.

Les faibles résultats obtenus dans la fécondation ne permettent pas une étude statistique.

CHAPITRE II :

Discussion des résultats.

I. Maturations.

Rappelons que la maturation ovocytaire se déroule à différents niveaux que l'on peut schématiser comme extracellulaire, cytoplasmique et nucléaire.

La maturation extracellulaire se concrétise par l'expansion des cellules de la corona radiata après leur rôle indispensable à la maturation nucléaire et cytoplasmique de l'ovocyte. La maturation cytoplasmique comporte différents phénomènes : contraction du cytoplasme, rupture des jonctions ovocytes-cellules périovocytaires, migration des mitochondries et de différentes vésicules au centre du cytoplasme et marginalisation contre la paroi des granules corticaux. La maturation nucléaire signifie la reprise de la méiose. En effet, bloquée en prophase de la première division réductionnelle (depuis la naissance), elle reprend alors jusqu'en métaphase de la deuxième division, atteinte une heure avant l'ovulation. Elle peut parfois s'observer par fixation de l'ovocyte grâce au premier globule polaire qui est rejeté en périphérie sous la zone pellucide (ce globule reste fugace). La méiose ne s'achèvera qu'à partir du moment où le spermatozoïde pénètre la membrane pellucide. C'est sur la maturation extraovocytaire que nous avons basé notre étude.

Le tout premier aspect intéressant à considérer dans nos résultats (*figure1*) est l'influence du FF sur la maturation ovocytaire. Celle-ci ne se fait pas sans FF ni FSH. Par contre, la présence simultanée de la FSH et du FF donne des taux de maturation de l'ordre de 70 %. D'autre part, dans la littérature, le fait que les deux soient nécessaires avait déjà été observé (Rath et al., 1995).

Dans ce mémoire nous nous sommes donnés pour but de tester différents facteurs de croissance en lieu et place du FF. Trois facteurs ont été testés, l'IGF-I, l'EGF et le TNF α .

En absence de FF mais en présence de ces GF, on obtient des taux de maturation satisfaisants (72 % pour l'IGF, 64 % avec l'EGF et 60 pour le TNF α).

L'IGF-I donne le taux numériquement le plus élevé mais pas significativement différent des autres GF. Dans la littérature, l'IGF-I a des effets variables selon les espèces. Il

est souvent observé une absence d'effet sur la MIV d'ovocytes ovins, alors que chez le porc, l'IGF-I stimule la MIV en présence de FSH (Singh et Armstrong, 1996 ; Sirotkin et al., 1998).

Ce facteur est présent dans le FF de la brebis où il est intensément sécrété par les cellules de la granulosa (Monget, 1993). Singh et Armstrong (1996) ont démontré que l'IGF-I est un composant du sérum de veau fœtal qui permet aux cellules du cumulus de s'expanser en réponse à la FSH in vitro lors de MIV chez la truie. Il semble donc que cette synergie indispensable entre la FSH et l'IGF-I existe également pour la maturation de l'ovocyte ovin.

L'EGF présente un effet important sur la MIV. Il stimule l'expansion du cumulus et la maturation méiotique des COC bovins (Lorenzo et al., 1995). Chez le porc, il stimule la maturation nucléaire et cytoplasmique des ovocytes in vitro (Uhm et al., 1998). Enfin, l'effet positif de l'EGF sur la maturation se retrouve aussi chez le chien (Russ et al., 1998). Il est cependant difficile d'observer toutes ces modifications de l'ovocyte (maturation nucléaire, cytoplasmique) dans nos expériences étant donné que nous nous sommes focalisés sur l'expansion du cumulus, signe de la maturation extraovocytaire la plus aisée à observer. En absence de fécondation nous sommes donc obligés de faire confiance à celle-ci pour dire qu'un ovocyte est mature.

Le $\text{TNF}\alpha$ serait un régulateur négatif des actions de la FSH sur les cellules de la granulosa (Maruo, 1995). Il apparaît cependant que le lieu de synthèse du $\text{TNF}\alpha$, dans l'ovaire, se trouve dans l'ovocyte lui-même et qu'il participe à la régulation de la croissance, de la régression et de l'atrésie folliculaire (Kondo et al., 1995). Le $\text{TNF}\alpha$ avec le LT B4 (LeukoTriène B4) et l'IL-1 α (Interleukine-1 α) prennent part dans le processus de dégradation du « mur » folliculaire, lors de l'ovulation. Leur corrélation au sein du follicule suggère un développement et une maturation folliculaire et ovocytaire optimisés (Bili H et al., 1998). Dans nos résultats, on constate qu'il a malgré tout un effet bénéfique sur la MIV et ce, en présence de FSH.

On ne voit pas d'effet additif significatif entre les facteurs de croissance et le FF, bien que l'addition de FF et d'EGF donne d'excellents résultats ; ceci pourrait nous faire dire que le GF est contenu dans le FF ou bien que notre méthode d'analyse passerait sous silence la différence entre le milieu seul + FF et le milieu + FF + GF. En effet on peut voir qu'il y a des différences entre ceux-ci dans nos résultats. Nous n'avons toutefois pas de preuve statistique d'un effet additif, mais l'absence de preuve n'est pas la preuve de l'absence.

On n'a pas pu montrer de différence non plus entre les GF et ce, que ce soit avec ou sans FF. En effet, les résultats obtenus sont trop proches pour montrer une différence significative.

II. Fécondation.

Malgré toutes les tentatives de fécondation et toutes les mise au point, nous ne sommes parvenus à n'avoir que quelques fécondations sur tous les ovocytes mis en culture depuis le début de ce travail. Nous ne pouvons donc pas tirer de conclusion à partir de ces résultats. Nous pouvons essayer d'émettre des hypothèses et des solutions potentielles.

La première hypothèse serait un problème de reconnaissance spermatozoïde / ovocyte dû à une capacitation inachevée.

La deuxième poserait un problème au niveau de l'observation. L'observation de deux pronuclei (résultats de la fécondation) est garant de la fécondation. L'observation simple au microscope après décoloration du cytoplasme n'a jamais permis d'observer ces deux pronuclei. La coloration au fluorochrome de Hoechst n'a pas mieux permis d'observer des fécondations. Il est donc très probable nous n'en ayons pas obtenues. Cependant, il est aussi possible que nous observions le noyau déjà formé de l'œuf au quel cas nous ne pourrions pas le différencier du pronucleus en formation d'un ovocyte immature. Une solution à ceci serait de poursuivre le développement embryonnaire ; dès qu'un clivage apparaît, on peut être sûr alors de la fécondation. Cependant, nous n'avons jamais observé de clivage.

La troisième consiste à dire que les ovocytes mis en maturation in vitro ne seraient pas encore assez matures pour être fécondés. Comme je l'ai dit dans le point sur la maturation, nous ne sommes sûrs que de la maturation extraovocytaire et pas de la maturation nucléaire (métaphase II). Cependant, la technique utilisée dans nos essais est basée sur celle qui a été mise au point à l'INRA de Nouzilly (France) où de bons taux de fécondation sont observés, ce qui laisse présumer que la maturation est acquise.

La dernière, et la plus probable, est la survie des spermatozoïdes, fortement compromise dans le milieu de fécondation, observation que nous n'avons malheureusement réalisée qu'à la fin du mémoire lors de la recherche systématique des causes de nos échecs. Peut-être tout simplement le lactate de sodium utilisé est-il en cause, mal conservé, infecté par une contamination,...

Conclusions

et perspectives

Le but de ce mémoire était d'étudier le rôle de différents GF sur la maturation in vitro (MIV) et sur la fécondation in vitro (FIV) afin de pouvoir compléter ou remplacer le fluide folliculaire (FF).

Au niveau de la MIV, nous avons montré que l'absence de FF et de FSH ne permet pas la maturation, pas plus que le FF ou la FSH seuls. Il n'y a que l'association des deux qui permette des taux de maturation élevés.

En présence de FSH, les trois GF (IGF-1, EGF et $\text{TNF}\alpha$) ont tous un effet positif sur la maturation in vitro, et entraînent chacun une expansion de la corona radiata au même titre que le FF.

Quand on additionne un GF au FF, il est impossible de dire si un des GF a un effet additif à ce FF. En effet, si l'addition de l'EGF donne un taux moyen de MIV supérieur au FF seul (76 % contre 71 %), cette amélioration n'est pas statistiquement significative.

On voit, par ces résultats, que les différents GF pourraient remplacer le FF pour ce qui est de la maturation. En effet, l'IGF seul donne des résultats égaux à ceux obtenus avec le FF. Quant à l'EGF et au TNF, ils donnent des résultats satisfaisants, qui ne sont d'ailleurs pas significativement différents de ceux de l'IGF.

Toutefois, il faudrait aller plus loin dans l'analyse des effets des GF. Tout d'abord, il faudrait mettre au point la fécondation in vitro et le développement embryonnaire pour évaluer l'action des GF au niveau des taux de fécondation, des taux de clivage, de la qualité des embryons et du taux de blastocystes obtenus et transférables dans un utérus et mesurer ainsi les effets sur l'acquisition de la «compétence» ovocytaire, seule réelle maturation à obtenir.

D'autres GF seraient aussi intéressants à étudier. Par exemple, le $\text{TGF}\beta 1$ qui stimule la maturation extraovocytaire. Particulièrement, le GDF-9 qui fait partie de la famille des $\text{TGF}\beta$, intervient pour coupler l'ovogenèse et la folliculogenèse. Il est un des facteurs les plus importants dans la folliculogenèse, principalement dans les stades précoces de celle-ci. Les interférons et plus particulièrement l'interféron tau sont aussi très importants, majoritairement dans le développement embryonnaire (surtout l' $\text{IFN}\tau$ chez les ruminants).

Enfin, après avoir décortiqué toutes les actions des GF sur la MIV, sur l'acquisition de la compétence à la fécondation, sur la FIV et sur le développement embryonnaire, il faudrait utiliser les différents GF à différents moments. Soit développer une technique de culture qui utiliserait différents cocktails de GF à différent moment. On aurait ainsi une culture en discontinu ou l'on ajouterait les GF au moment où ils sont nécessaires.

Ces deux facteurs principaux, IFN τ et GDF-9 n'étaient pas disponibles dans le commerce au début des essais et n'ont donc pu être testés. Il est permis de s'attendre à un effet positif de ces GF, le premier lors du développement embryonnaire précoce et le second lors de la maturation ovocytaire. A tester dès qu'ils seront disponibles...

Ces expériences permettraient de ne plus utiliser le FF (qui reste un fluide corporel contenant beaucoup d'inconnues) et d'avoir une MIV et une FIV bien contrôlées.

Les perspectives sont donc énormes dans ce sujet de recherche dont les conclusions auront des applications très importantes dans le domaine de la fécondation in vitro et la culture cellulaire eucaryote en général.

Références

bibliographiques

- Aggarwal BB.** Tumor necrosis factor. Dans Gutterman JU, Aggarwal BB (Eds), « Human cytokines handbook for basic and clinical researchers », Blackwell 1992 ; cité dans Nicos A. Nicola (Ed)), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press. ISBN 0-19-859947-1.
- Albertini DF, Elvin J, Matzuk MM, Carabastos MJ.** Growth differentiation factor-9 : a novel member that regulates ovarian follicular development. *Biol Reprod* 1998 ; 58 :133.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD.** « Molecular biology of the cell » 1989, Garland Publishing. ISBN 0-8240-3695-6.
- Amento EP, Becks LS.** TGF-beta and wound healing. *Ciba foundation symposium* 1991 ; cité dans Nicos A. Nicola (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press. ISBN 0-19-859947-1.
- Anasti JN, Kalantaridou SN, Kimzey LM, George M, Nelson LM.** Human follicle fluid vascular endothelial growth factor concentrations are correlated with luteinization in spontaneously developing follicles. *Human reprod* 1998 ; 13(5) : 1144-1147.
- Arteaga CL, Carty-Dugger T, Moses HL, Hurd SD, Pietenpol JA.** Transforming growth factor beta 1 can induce estrogen-independent tumorigenicity of human breast cancer cells in athymic mice. *Cell Growth Diff* 1993 ; cité dans Nicos A. Nicola (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press. ISBN 0-19-859947-1.
- Asselin E, Lacroix D, Fotier MA.** IFN-tau increases PGE2 production and COX-2 gene expression in the bovine endometrium in vitro. *Mol cell endocrinol* 1997 ; 132 : 117-126.
- Athanassiades A, Hamilton GS, Lala PK.** Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast. *Biol Reprod* 1998 ; 59 : 643-654.
- Austgulen R, Arntzen KJ, Vatten LJ, Kahn J, Sunde A.** Detection of cytokines (interleukin-1, interleukin-6, transforming growth factor) and soluble tumor necrosis factor receptors in embryo culture fluids during in vitro fertilization. *Hum Reprod* 1995 ; 10(1) : 171-176.
- Austin CR, Short RV (Eds).** « Hormones in reproduction » 1972, Cambridge University Press. ISBN 521-09696-0.
- Austin DJ, Ishikawa M, Das SK, Dey SK, Klagsbrun M, Nowak RA.** Heparin-binding epidermal growth factor is expressed in human endometrium and stimulates proliferation of endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 214.
- Badinga L, Song S, Yang J, Collante WR, Simmen RCM, Simmen FA.** Recombinant porcine insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) interacts with human insulin-like growth factor-II (IGF-II) to modulate human and porcine uterine epithelial cell proliferation. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 104.

- Balwant S, Armstrong DT.** Insulin-like growth factor I, a component of serum that enables porcine cumulus cells to expand in response to follicle-stimulating hormone in vitro. *Biol reprod* 1997 ; 56 : 1370-1375.
- Barak V, Mordel N, Holzer H, Zajicek G, Treves AJ, Laufer N.** The correlation of interleukine and tumor necrosis factor to oestradiol, progesterone and testosterone levels in periovulatory follicular fluid of in-vitro fertilization patients. *Hum Reprod* 1992 ; 7(4) : 462-464.
- Basilico C, Moscatelli D.** The FGF family of growth factor and oncogens. *Adv Cancer Res* 1992 ; Nicos A. Nicola (Ed)), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press.
- Bazer FW, Spencer TE, Ott TL.** Placental interferons. *AM J Reprod Immunol* 1996 ; 35 : 297-308.
- Bazer FW, Spencer TE, Ott TL.** Interferon tau : a novel pregnancy recognition signal. *Am J Reprod Immunol* 1997 ; 37 : 412-420.
- Bellot F, Crumley G, Kaplow JM, Schlessinger J, Jaye M, Dionne CA.** Ligand-induced transphosphorylation between different FGF receptors. *EMBO J* 1991 ; cité dans Nicos A. Nicola (Ed)), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press. ISBN 0-19-859947-1.
- Besnard N, Pisselet C, Monniaux D, Monget P.** Proteolytic activity degrading insulin-like growth factor-binding protein -2, -3, -4, and -5 in healthy growing and atretic follicles in the pig ovary. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 1050-1058.
- Best CL, Pudney J, Anderson DJ, Hill JA.** Modulation of human granulosa cell steroid production in vitro by tumor necrosis factor alpha: implications of white blood cells in culture. *Obstet Gynecol* 1994 ; 84(1) : 121-127.
- Bieser B, Stojkovic M, Wolf E, Meyer H, Einspanier R.** Growth factors and components for extracellular proteolysis are differentially expressed during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes. *Biol Reprod* 1998 ; 59 : 801-806.
- Bili H, Tarlatzis BC, Daniilidis M, Fleva M, Bontis J, Tourkantonis A, Mantalenakis S.** Cytokines in the human ovary : presence in follicular fluid and correlation with leukotriene B4. *J Assist Reprod Genet* 1998 ; 15(2) : 93-98.
- Bister JL.** « La reproduction assistée chez l'homme et les mammifères domestiques » 1999, Syllabus de cours donné aux facultés Universitaires Notre-Dame de la paix, Namur.
- Brisson DR, Schultz RM.** Apoptosis during mouse blastocyst formation : evidence for a role for survival factors including transforming growth factor α . *Biol Reprod* 1997a ; 56 : 1088-1096.

- Brison DR, Schultz RM.** Transforming growth factor α (TGF α) regulates apoptosis in mouse blastocysts : analysis of TGF α knockout embryos using TUNEL. *J Reprod Fertil* 1997b ; 19 :10.
- Brison DR, Schultz RM.** Increased incidence of apoptosis in transforming growth factor α - deficient mouse blastocysts. *Biol Reprod* 1998 ; 59 : 136-144.
- Brodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CM, Sawyer HR.** Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol Reprod* 1999 ; 60 : 381-386.
- Brown RE.** The pituitary gland and its hormones. Dans Brown RE (Ed) « An introduction to neuroendocrinology » 1994, Cambridge University Press, Canada, 30-39.
- Burgess WH, Maciag T.** The héparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Rev Biochem* 1989 ; cité dans Nicos A. Nicola (Ed)), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press. ISBN 0-19-859947-1.
- Bush MR, Mele JM, Couchman GM, Walmer DK.** Evidence of juxtacrine signaling for transforming growth factor α in human endometrium. *Biol Reprod* 1998 ; 59 :1522-1529.
- Campbel NA.** « Biologie ». *De Boeck Université (De Boeck-Wesmael s.a.)* 1995. ISBN 2-8041-2084-8.
- Campbell BK, Scaramuzzi RJ, Webb R.** IGF-I stimulates œstradiol production in sheep, both in vitro and in vivo. *J Reprod and Fertil* 1995 ; 16 : 17.
- Carlsson B, Nilsson OGP, Billig H.** Growth hormone messenger RNA in the rat ovary : regulation and localization. *Mol cell Endocrinol* 1993 ; 95 : 59-66.
- Charnock-Jones DS, Clarck DE, Licence D, Wooding FBP, Smith SK.** Distribution of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and binding sites at the maternal-fetal interface throughout gestation in the pig. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 231.
- Chen HL, Marcinkiewicz JL, Sancho-Tello M, Hunt JS, Terranova PF.** Tumor necrosis factor-alpha gene expression in mouse oocytes and follicular cells. *Biol Reprod* 1993 ; 48 (4) : 707-714.
- Choi D, Rohan RM, Rosenfeld RG, Matsumoto T, Gargosky SE, Adashi EY.** Activin-attenuated expression of transcripts encoding granulosa cell-derived insulin-like growth factor-binding proteins -4 and -5 in the rat : a putative antiatretic effect. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 508-515.
- Clarck DE, Smith SK, He Y, Day KA, Licence DR, Corps AN, Lammoglia R, Charnock-Jones DS.** A vascular endothelial growth factor antagonist is produced by the human placenta and released into the maternal circulation. *Biol Reprod* 1998 ; 59 : 1540-1548.

- Cohick WS, Clemmons DR.** The insulin-like growth factors. *Annu Rev physiol.* 1993 ; 55 : 131-153.
- Correia da Silva G, Teixeira N, Pringle H, Bell SC.** Expression of insuline-like growth factors-I and II (IGF-I, IGF-II) mRNA by rat non-pregnant and pregnant uterine tissues. *J Reprod Fertil* 1993 ; 12 : 15.
- Davis SR, Smith JF, Gluckman PD.** Effects of growth hormone injections on ovulation rate in ewes. *Reprod Fertil Dev.* 1990 ; 2 : 173-8.
- Dawson A, Reynolds TS, Boulton M, Peters AR.** Expression of the mRNA for IGF-II and type-1 IGF receptor in the ovary of sow throughout the œstrous cycle. *J Reprod Fertil* 1997 ; 19 : 47-48.
- De la Sota RL, Simen FA, Thatcher WW.** Insuline-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordonate follicles. *Biol Reprod* 1996 ; 55 : 803-812.
- Derynk R.** The biological complexity of transforming growth factor β . Dans Thompson A (Ed), « cytokine handbook », 1994 ; cité dans Nicos A. Nicola (Ed) , « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press. ISBN 0-19-859947-1.
- Dey SK.** Ligand-receptor signaling of EGF-related growth factors in implantation. *J Reprod Fertil* 1995 ; 16 : 4.
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM.** Growth/différenciation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996 ; 383 : 531-535.
- Doraiswamy V, Moor RM, Dai Y, Reynolds LP, Redmer DA.** Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the ovine ovary during the preovulatory period. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 123.
- Doraiswamy V, Reynolds LP, Redmer DA.** Expression and localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in ovine corpora lutea (CL) throughout the estrous cycle. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 146.
- Drive PM, Forbes JM.** Episodic growth hormone secretion in sheep in relation to time of feeding, spontaneous meals and short term fasting. *J Physiol* 1981 ; 317 : 413-424.
- Duleba AJ, Spaczynski RZ, Olive DL, Berhman HR.** Effects of insuline-like growth factors on proliferation of rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 891-897.
- Duleba AJ, Spaczynski RZ, Olive DL.** Insulin and insulin-like growth factors stimulate proliferation of human ovarian theca-interstitial cells. *Fertil Steril* 1998 ; 69(2) : 335-340.

- Eisenhauer KM, Chung S-Y, Billig H, Hsueh AJW.** Growth hormone suppression of apoptosis in preovulatory rat follicles and partial neutralization by insuline-like growth factor-binding protein. *Biol Reprod* 1995 ; 53 : 13-20.
- Elde R, Cao YH, Cintra A, Brelje TC, Pelto-Huikko M, Junttila T, Fuxe K, Pettersson RF, Hökfelt T.** Prominent expression of acidic fibroblast growth factor in motor and sensory neurones. *Neuron* 1991 ; cité dans Nicos A. Nicola (Ed) , « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press. ISBN 0-19-859947-1.
- Ferrara N.** Vascular endothelial growth factor. *Eur J Cancer* 1996 ; 32A no 14 : 2413-2422.
- Flores JM, Sanchez MA, Garcia P, Sanchez B, Nieto A.** Immunohistochemical localization of epidermal growth factor, transforming growth factor α and growth factor β in the caprine peri-implantation period. *Theriogenology* 1998 ; 50 : 931-944.
- Fraser HM, Lunn SF, Kim H, Erickson GF.** Localization of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) mRNA in the primate ovary. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 113.
- Frelin C, Ladoux A, Bauters C.** VEGF : médiateur de l'angiogenèse hypoxique. *Méd/Sci* 1997 ; 13 : 886-891.
- Fulop C, Kamath RV, Li Y, Otto JM, Salustri A, Olsen BR, Glant TT, Hascall VC.** Coding sequence, exon-intron structure and chromosomal localization of murine TNF-stimulated gene 6 that is specifically expressed by expanding cumulus cell-oocyte complexes. *Gene* 1997 ; 202 (1-2) : 95-102.
- Gabler C, Einspanier R.** Effects of fibroblast growth factor-1 (FGF-1), FGF-2, estradiol and progesterone on the expression of the FGF receptor (FGFR) in cultures of bovine oviduct epithelial cells. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 216.
- Gabler C, Lauer B, Einspanier A, Schams D, Einspanier R.** Detection of mRNA and immunoreactive proteins for acidic and basic fibroblast growth factor and expression of fibroblast growth factor receptors in the bovine oviduct. *J reprod fertil* 1997 ; 109 : 213-221.
- Gandolfi F.** Embryonic développement from zygote to blastocyst. *Theriogenology* 1992 ; 37 : 95-98.
- Gardner RL, Squire S, Zaina S, Hills S, Graham CF.** Insulin-like growth factor-II regulation of conceptus composition : effect of the trophoctoderm and inner cell mass genotypes in the mouse. *Biol Reprod* 1999 ; 60 : 190-195.
- Garrette B (Ed).** Eurêka, « numéro spécial fécondation in vitro » 1999.
- Graff KJ, Meintjes M, Dyer VW, Paul JB, Denniston RS, Ziomek C, Godke RA.** Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. *Theriogenology* 1999 ; 51 : 1099-1119.

- Grove BH, Lewis M, Mak J, Erickson ME, Unemori EN.** Relaxin is a potent and specific stimulator of vascular endothelial growth factor expression in normal human endometrial cells in vitro. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 191.
- Gupta A, Bazer FW, Dekaney CM, Ing NH, Jaeger LA.** Expression of beta transforming growth factors (TGF β s) in the porcine peri-implantation uterus. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 142.
- Gupta A, Ing NH, Bazer FW, Bustamante LS, Jaeger LA.** Beta transforming growth factors (TGF β s) at the porcine conceptus-maternal interface. Part I : expression of TGF β 1, TGF β 2, and TGF β 3 messenger ribonucleic acid. *Biol Reprod* 1998a ; 59 : 905-910.
- Gupta A, Dekaney CM, Bazer FW, Madrigal MM, Jaeger LA.** Beta transforming growth factors (TGF β) at the porcine conceptus-uterine interface. Part II : uterine TGF β bioactivity and expression of immunoreactive TGF β s (TGF β 1, TGF β 2, and TGF β 3) and their receptors (type I and type II). *Biol Reprod* 1998b ; 59 : 911-917.
- Guthrie HD, Grimes RW, Hammon JM.** Changes in insulin-like growth factor binding protein-2 and -3 in follicular fluid during atresia of follicles grown after ovulation in pigs. *J Reprod Fertil* 1995 ; 104 : 225-230.
- Hamilton GS, Lala PK.** Potencial mechanism for enhancement of trophoblast invasion by insulin-like growth factor (IGF-II) and IGF-binding protein (IGFBP-1). *Biol Reprod* 1999 ; 54 : 130.
- Hannun YA.** « Sphingolipid-mediated signal transduction » 1997, Springer. ISBN 3-540-62714-6.
- Henemyre C, Markoff E.** Decidualization and expression of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-4 in the preimplantation embryo. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 801-806.
- Herington AC, Ymer SI, Stevenson JL, Roupas P.** Growth hormone receptor/binding protein : physiology and function. *PSEBM* 1994 ; 206 : 236-242.
- Herrler A, Beier HM.** IGF-I binding in preimplantation rabbit embryos and their coverings. *J Reprod Fertil* 1995 ; 16 : 65.
- Herrler A, Einspanier R, Beier HM.** Binding of IGF-I to preimplantation rabbit embryos and their coats. *Theriogenology* 1997 ; 47 : 1595-1607.
- Hommel U, Harvey TS, Driscoll PC, Campbell ID.** Human epidermal growth factor : high resolution solution structure. *J Mol Biol* 1992 ; 227 : 271-282.
- Hrabé de Angelis M, Grunker G, Viebahn C, Kirchner C.** bFGF prevents endoderm degeneration and induces mesoderm formation in rabbit blastocysts in a protein-free in vitro culture. *J Reprod Fertil* 1995 ; 16 : 8.

- Ikeda A, Matsumoto Y, Chang K-T, Nakano T, Matsuyana S, Yamanouchi K, Ohta A, Nishihara M, Tojo H, Sasaki F, Takahashi M.** Different female reproductive phenotypes determined by human growth hormone (hGH) levels in hGH-transgenic rats. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 847-851.
- Im KS, Park KW.** Effect of epidermal growth factor on maturation, fertilization and development of bovine follicular oocytes. *Theriogenology* 1995 ; 44 : 209-216.
- Izadyar F, Colenbrabder B, Bevers MM.** In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. *Mol Reprod Devel* 1996b ; 45 : 372-377.
- Johnson GA, Austin KJ, Van Kirk EA, Hansen TR.** Pregnancy and interferon tau induce conjugation of bovine ubiquitin cross-reactive protein to cytosolic uterine proteins. *Biol Reprod* 1998 ; 58(4) : 898-904.
- Juengel JL, Nett TM, Anthony RV, Niswender GD.** Effects of luteotrophic and luteolytic hormones on expression of mRNA encoding insulin-like growth factor I and growth hormone receptor in the ovine corpus luteum. *J Reprod fertil* 1997 ; 110 : 291-298.
- Kahn CR, Smith RJ, Chin WW.** Mechanism of action of hormones that act at the cell surface. Dans Wilson JD, Foster DW (Eds) « Textbook of endocrinology » 1992, W.B. Saunders Company, 91-134.
- Keefer CL, Stice SL, Paprocki AM, Golueke P.** In vitro culture of bovine IVM-IVF embryos : cooperative interaction among embryos and the role of growth factors. *Theriogenology* 1994 ; 41 : 1323-1331.
- Kehrl JH.** Transforming growth factor beta : an important mediator of immunoregulation. *Int J Cell Cloning* 1991 ; cité dans Nicos A. Nicola (Ed) , « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press. ISBN 0-19-859947-1.
- Khan-Dawood FS, Gargiulo AR, Dawood MY.** In vitro microdialysis of the ovine corpus luteum of pregnancy : effects of insulin-like growth factor on progesterone secretion. *Biol Reprod* 1994 ; 51 : 1299-1306.
- Kiefer MC, Stephans JC, Crawford K, Okino K, Barr PJ.** Ligand-affinity cloning and structure of a cell surface heparan proteoglycan that binds basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci* 1990 ; cité dans Nicos A. Nicola (Ed) , « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press. ISBN 0-19-859947-1.
- Kliem A, Fischer b.** A truncated form of the EGF-receptor is secreted in the porcine uterus. *J Reprod Fertil* 1997 ; 19 : 30-31.
- Kliem A, Tetens F, Niemann H, Fischer B.** Only a truncated epidermal growth factor receptor protein is present in porcine endometrium. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 1367-1371.
- Kondo H, Maruo T, Mochizuki M.** Immunohistochemical evidence for the presence of tumor necrosis factor-alpha in the infant and adult human ovary. *Endocr J* ; 1995 : 42(6) : 771-780.

- Koos Rd, Rocca MS, Pillai SB, Olson CE.** Inhibition of vascular endothelial growth factor action blocks estrogen-induced edema in the rat uterus. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 213.
- Lands WEM (Ed).** « Biochemistry of arachidonic acid metabolism » 1989, ISBN 0-89838-717-5.
- Langford K, Nicolaides K, Miell JP.** Maternal and fetal insulin-like growth factors and their binding proteins in the second and third trimesters of human pregnancy. *Hum Reprod* 1998 ; 13 (5), 1389-1393.
- Lennard SN, Gerstenberg C, Allen WR, Stewart F.** Expression of epidermal growth factor and its receptor in equine placental tissues. *J Reprod Fertil* 1998 ; 112 : 49-57.
- Li J, Tsang BK.** Regulation of cytosolic phospholipase A₂ in granulosa cells by transforming growth factor in vitro during follicular development. *Biol Reprod* 1999 ; 54 : 57.
- Lighten AD, Moore GE, Winston RM, Hardy K.** Role of maternal IGF-I in the development of the human preimplantation embryo. *J Reprod Fertil* 1997 ; 20 : 5.
- Lighten AD, Moore GE, Winston RM, Hardy K.** Routine addition of human insulin-like growth factor-I ligand could benefit clinical in vitro fertilization culture. *Hum Reprod* 1998 ; 13(11) : 3144-3150.
- Lim JM, Hansel W.** Growth factors in development of bovine embryos cultured in a defined medium. *Biol Reprod* 1996 ; 54 : 127.
- Lindsey JS, Brenner RM.** Rhesus macaque endometrium expresses two novel transcripts of hepatocyte growth factor/scatter factor. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 173.
- Liu SH, Ing NH, Bazer FW.** Splice variants of keratinocyte growth factor receptor (KGFR) mRNA are expressed in the pig endometrium and fetal skin. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 102.
- Lodish, Baltimore, Berk, Zipursky, Matsudaira, Darnell.** « Biologie Moléculaire de la Cellule » 1997, De Boeck Université s.a.. ISBN 2-7445-0001-1.
- Lonergan P, Carolan C, Van Langendonck A, Donnay I, Khatir H, Mermilod P.** Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol Reprod* 1996 ; 54 : 1420-1429.
- Lorenzo PL, Illera Mj, Illera JC, Illera M.** Role of EGF, IGF-I, sera and cumulus cells on maturation in vitro of bovine oocytes. *Theriogenology* 1995 ; 44 : 109-118.
- Machelon V, Nome F, Emilie D.** Regulated on activation normal T expressed and secreted chemokine is induced by tumor necrosis factor-alpha in granulosa cells from human preovulatory follicle. *J Clin Endocrinol Metab* 2000 ; 85(1) : 417-424.

- Magoffin DA, Weitsman SR.** Insulin-like growth factor-I regulation of luteinizing hormone (LH) receptor messenger ribonucleic acid expression and LH-stimulated signal transduction in rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol Reprod* 1994 ; 51 : 766-775.
- Magoffin DA, Hubert-Leslie D, Zachow RJ.** Estradiol-17 β , insulin-like growth factor-I, and luteinizing hormone inhibit secretion of transforming factor β by rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol reprod* 1995 ; 53 : 627-635.
- Marcinkiewicz JL, Krishna A, Cheung CM, Terranova PM.** Oocytic tumor necrosis factor α : localization in the neonatal ovary and throughout follicular development in the adult rat. *Biol Reprod* 1994 ; 50(6) : 1251-1260.
- Martin FH, Suggs SV, Langley KE, Lu HS, Ting J, Okino KH, Morris CF, Mc Niece IK, Jacobsen FW, Mendiaz EA, Birkett NC, Smith KA, Johnson MJ, Parker VP, Flores JC, Patel AC, Fisher EF, Erjavec HO, Herrera CJ, Wypych J, Sachdev RK, Pope J, Leslie I, Wen D, Lin CH, Cupples RL, Zsebo KM.** Primary structure and fonctionnal expression of rat and human stem cell factor. Dans *Cell* 1990 ; cité dans Nicos A. Nicola (Ed) , « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press. ISBN 0-19-859947-1.
- Maruo T.** Expression of oncogenes, growth factor and their receptors in follicular growth, regression and atresia : their roles in granulosa cell proliferation and differentiation. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 1995 ; 47(8) : 738-750.
- Massagué J.** The transforming growth factor beta family. *Annu Rev cell Biol* 1990 ; cité dans Nicos A. Nicola (Ed) , « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press. ISBN 0-19-859947-1.
- Massagué J, Pandiella A.** Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev biochem* 1993 ; cité dans Nicos A. Nicola (Ed) , « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press.
- Mau Y-HL, May JV.** Central role of mitogen-activated kinase (MAPK) kinase in theca cell transforming growth factor β 1 (TGF β 1) expression. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 230.
- Mc Niece IK, Langley KE, Zsebo KM.** The role of recombinant stem cell factor in early B cell development. Synergistic interaction with IL-7. *J Immunol* 1991 ; cité dans Nicos A. Nicola (Ed) , « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press. ISBN 0-19-859947-1.
- Mellor SJ, Thomas EJ.** Interactions between oestradiol and epidermal growth factor in endometrial stromal proliferation and differentiation. *J Reprod Fertil* 1995 ; 104 : 157-164.
- Monget P.** Le système IGF dans l'ovaire de brebis. Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en Science, Station INRA de physiologie de la reproduction de mammifères domestiques 1993, Tours, France.

- Morris DG, Grealy M, Sreenan JM.** Effect of immunization against synthetic peptide sequence of bovine inhibin α -subunit on gonadotrophin concentration in heifers. *An Reprod Sci* 1995 ; 38 : 63-71.
- Naz RK, Zhu X, Menge AC.** Expression of tumor necrosis factor-alpha and its receptor type-I and type-II in human oocytes. *Mol Reprod Dev* 1997 ; 47(2) : 127-133.
- Neulen J, Yan Z, Weich HA, Bernart W, Breckwoldt M.** Vascular endothelial growth factor (VEGF) messenger ribonucleic acid (mRNA) expression in luteinized human granulosa cells in vitro. *J Reprod Fertil* 1995 ; 16 : 31.
- Nico A. Nicola (Ed).** « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press. ISBN 0-19-859947-1. ISBN 0-19-859947-1.
- Noël B, Bister JL, Botspoel N, Paquay R.** Effects of growth factors (IGF-I, EGF and TGF β) on steroidogenesis of entire dominant follicles in an in vitro perfusion system. *Eur J Physiol* 1994 ; 426 : R10-30.
- Noël B, Perrad B, Mandiki SNM, Bister JL, Paquay R.** Effects of IGF-I and EGF on steroidogenesis and sensitivity to LH-FSH of entire dominant follicles perfused in vitro. *3rd Conf Farm An Endocrinol* 1998a ; 71.
- Noël B, Perrad B, Mandiki SNM, Bister JL, Paquay R.** Effects of IGF-I on steroidogenesis and sensitivity to LH-FSH of entire dominant follicles prelevé during the anoestrus. *3rd Conf Farm An Endocrinol* 1998b ; 72.
- Nowak RA, Haimovici F, Biggers Jd, Erbach GT.** Transforming growth factor β stimulates mouse blastocyst outgrowth through a mechanism involving parathyroid hormone-related protein. *Biol Reprod* 1999 ; 60 : 85-93.
- Palma GA, Müller M, Brem G.** Effect of insulin-like growth factor I (IGF-I) at high concentrations on blastocyst development of bovine embryos produced in vitro. *J Reprod Fertil* 1997 ; 110 : 347-353.
- Palmieri SL, Stiles CD, Mercola M.** PDGF in the developing embryo. Dans Westermack B, Sorg C (Eds), « Biology of platelet-derived growth factor. Cytokines », Karger ; cité dans Nico A. Nicola (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press. ISBN 0-19-859947-1.
- Parrott Ja, Skinner Mk.** Theca cell-granulosa cell interactions that induce primordial follicles development and promote folliculogenesis. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 125.
- Paul NL, Ruddle NH.** Lymphotoxin. *Ann Rev Immunol* 1998 ; cité dans Nico A. Nicola (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997 ; Oxford University Press.
- Pelton RW, Saxena B, Jones M, Moses HL, Gold LI.** Immunohistochemical localization of TGF beta 1, TGF beta 2, and TGF beta 3 in the mouse embryo : expression patterns suggest multiple roles during embryonic development. *J Cell Biol* 1991 ; cité dans Nico A. Nicola (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press.

- Pescador N, Murphy Bd.** IGF-I advances and EGF blocks StAR gene expression during luteinization of porcine granulosa cells. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 212.
- Rasmussen CA, Peschon J,k Banerjee S, Hunt JS.** Role of tumor necrosis factor α in mouse placenta. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 153.
- Rath D, Niemann H, Tao T.** In vitro maturation of porcine oocytes in follicular fluid with subsequent effects on fertilization and embryo yield in vitro. *Theriogenology* 1995 ; 44 : 529-538.
- Redmer DA, Kraft KC, Kirsch JD, Reynold LP.** Immunohistochemical localization of vascular endothelial growth factor (VEGF) in bovine and ovine adult and fetal organs. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 191.
- Reynolds TS, Wathes DC, Aitken RP, Wallace JM.** Expression of insulin-like growth factor-binding protein-5(IGFBP-5) in the pregnant ovine uterus. *J Reprod Fertil* 1997 ; 19 : 48-49.
- Rieger D, Luciano AM, Modina S, Pocar P, Lauria A , Gandofil F.** The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle ovocytes in vitro. *J Reprod Fertil* 1998 ; 112 :123-130.
- Roberts AB, Sporn Mb.** The transforming growth factor β s. Dans Sporn MB, Roberts AB (Eds), « Peptide growth factors and their receptors », Springer ; cité dans Nico A. Nicola (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1994, Oxford University Press.
- Roby KF, Hunt JS.** Myometrial tumor necrosis factor α : cellular localization and regulation by estradiol and progesterone in the mouse. *Biol Reprod* 1995 ; 52 : 509-515.
- Rocca MS, Koos RD.** Expression of mRNA for keratinocyte growth factor (KGF) and its receptor (KGFR) in the mouse uterus. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 103.
- Roy SK, Carlson AM.** Gonadotropin regulation of transforming growth factor receptor gene expression in hamster ovarian follicles. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 203.
- Russ KD, Bolamba D, Harper SA Sandler JL, Durrant BS.** Effects of epidermal growth factor and hormones on cumulus expansion and nuclear maturation of cultured dog oocytes. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 147.
- Sakumoto R, Sakabe Y, Kawate N, Okuda K.** Tumor necrosis factor α receptors in bovine corpora lutea in the estrous cycle. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 79.
- Salli U, Bartol FF, Wiley AA Tarleton BJ, Braden TD.** Keratinocyte growth factor expression by the bovine corpus luteum. *Biol Reprod* 1998 ; 59 : 77-83.
- Samathanam CA, Adesanya OO, Zhou J, Wang J, Bondy Ca.** Fibroblast growth factors 1 and 2 in the primate uterus. *Biol Reprod* 1998 ; 59 : 491-496.

- Saragüea PE, Colman-lerner AA, Lanuza GM, Fischman ML, Barano JL.** Interactions between TGF β and follistatin in granulosa cells. *Biol Reprod* 1996 ; 54 : 155.
- Schams D, Kamhuber M, Einspanier R.** Expression changes of growth factors, receptors and p450-aromatase during recruitment, selection and dominance of bovine follicles. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 125.
- Singh B, Armstrong DT.** IGF-I, a component of serum that enables porcine cumulus cells to expand in response to FSH in vitro. *Biol Reprod* 1996 ; 54 : 187.
- Sirotkin AV, Taradajnik TE, Makarevich AV, Bulla J.** Effect of follicular cells, IGF-I and tyrosine kinase blockers on oocyte maturation. *An Reprod Sci* 1998 ; 51 : 333-344.
- Slayden OD, Rubin J, Lacey D, Brenner RM.** Keratinocyte growth factor (KGF) stimulates epithelial cell proliferation in the primate oviduct and vagina. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 103.
- Spencer TE, Bazer FW.** Ovine interferon-tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. *Endocrinology* 1996 ; 137 : 1144-1147.
- Spencer TE, Becker WC, George P, Mirando MA, Ogle TF, Bazer FW.** Ovine interferon tau inhibits estrogen receptor up-regulation and estrogen-induced luteolysis in cyclic ewes. *Endocrinology* 1995a ; 136 : 4932-4944.
- Spencer TE, Ing NH, Ott TL, Mayes JS, Becker WC, Watson GH, Mirando MA, Bazer FW.** Intrauterine injection of ovine interferon-tau alters oestrogen receptor and oxytocin receptor expression in the endometrium of cyclic ewes. *J Mol Endocrinol* 1995b ; 15 : 203-220.
- Spencer TE, Mirando MA, Mayes JS, Watson GH, Ott TL, Bazer FW.** Effects of interferon-tau and progesterone on oestrogen-stimulates expression of receptors for oestrogen, progesterone and oxytocin in the endometrium of ovariectomized ewes. *Reprod Fertil Dev* 1996a ; 8 : 843-853.
- Spencer TE, Ott TL, Bazer FW.** Tau-interferon : pregnancy recognition signal in ruminants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996b ; 213 : 215-229.
- Spicer LJ, Klindt J, Buonomo FC, Maurer R, Yen JT, Echternkamp SE.** Effect of porcine somatotropin on number of granulosa cell luteinizing hormone/human gonadotropin receptors, oocyte viability, and concentrations of steroids and insulin-like growth factor I and II in follicular fluid of lean and obese gilts. *J Anim Sci* 1992 ; 70 : 3149-3157.
- Spriggs DR, Deutsh S, Kufe DW.** Genomic structure induction, and production of TNF α . Dans Aggarwal DR, Vilcek J (Eds), « Tumor necrosis factor structure, function, and mechanism of action » Marcel Dekker 1992 ; cité dans Nicos A. Nicola (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press. ISBN 0-19-859947-1.

- Sugawara J, Kukaya T, Murakami T, Yoshida H, Yajima A.** Hepatocyte growth factor stimulates proliferation, migration, and lumen formation of human endometrial epithelial cells in vitro. *Biol Reprod* 1997 ; 57 : 936-942.
- Surveyor GA, Brigstock DR.** Localization of uterine connective tissue growth factor during early pregnancy in the mouse. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 118.
- Tanaka A, Miyamoto K, Minamino N, Takeda M, Sato B, Matsuo H, Matsumoto K.** Cloning and characterization of an androgen-induced growth factor essential for the androgen-dependent growth of mouse mammary carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci* 1992 ; cité dans Nicos A. Nicola (Ed) , « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press. ISBN 0-19-859947-1.
- Teixeira MG, Austin KJ, Perry DJ, Dooley VD, Johnson GA, Francis BR, Hansen TR.** Bovine granulocyte chemotactic protein-2 is secreted by the endometrium in response to interferon-tau (IFN-tau). *Endocrine* 1997 ; 6 : 31-37.
- Tekpetey F, Singh B, Croy A, Armstrong B.** Localization of colony stimulating factor-1 (CSF-1) receptor (c-fms) in the pig ovary, and csf-1 modulation of FSH and EGF-induced pig oocyte maturation. *Biol Reprod* 1996 ; 54 : 127.
- Testart J.** « L'œuf transparent » Flammarion (Eds) 1986. ISBN 2-08-081157-6.
- Testart J, Lassalle B.** La fécondation assistée. 1989 ; 245-251.
- Todd I, McElveen JE, Lamming GE.** Ovine trophoblast interferon enhances MHC class I expression by sheep endometrial cells. *J Reprod Immunol* 1998 ; 37(2) : 117-123.
- Tortora GJ, Grabowski SR (Eds).** « Principes d'anatomie et de physiologie » 1994, De Boeck Université, Canada : 984-1035. ISBN 2-8041-1024-9.
- Tremellen KP, Seamark RF, Robertson SA.** Seminal transforming growth factor β 1 stimulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and inflammatory cell recruitment in the murine uterus. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 1217-1225.
- Ueno H, Gunn M, Dell K, Tseng A Jr, Williams LT.** A truncated form of fibroblast growth factor receptor 1 inhibits signal transduction by multiple types of fibroblast growth factor receptor. *J Biol Chem* 1992 ; cité dans Nicos A. Nicola (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press. ISBN 0-19-859947-1.
- Uhm SJ, Chung HM, Seung KR, Kim NH, Lee HT, Chung KS.** Interactive effects of epidermal growth factor, transforming growth factor beta and gonadotropin on in vitro maturation of porcine oocytes. *Theriogenology* 1998 ; 49 : 319.
- Unemori EN, Erikson ME, Grove BH.** Relaxin stimulates expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal human endometrial stromal cells. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 176.

- Uzumeu M, Al-Homsi MF, Brigstock DR, Ayberk H, Coskun S, Jaroudi K, Hollenders JMG.** Immunohistochemical localization of connective tissue growth factor in human endometrium and decidua. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 197.
- Van Den Huck R, Bevers MM, Beckers JF.** In vivo and in vitro development of prenatral follicles. *Theriogenology* 1997 ; 47 : 73-82.
- Wang LJ, Brannstrom M, Robertson SA, Norman RJ.** Tumor necrosis factor alpha in the human ovary : presence in follicular fluid and effects on cell proliferation and prostaglandine production. *Fertil Steril* 1992 ; 58(5) : 934-940.
- Ward SJ, Perks CP, Scaramuzzi RJ, Wathes DC.** Insulin-like growth factor-II (IGF-II) and aromatase mRNA expression in the ovary of ewes on high and low nutrition diets. *J Reprod Fertil* 1997 ; 19 : 60-61.
- Wehrenberg U, Rune GM.** Expression of TGF β receptor type II during luteinization in marmoset ovaries : comparison of the cellular localization in vivo with hCG stimulated follicle cultures. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 147.
- Wheater PR.** « Histologie fonctionnelle ». *Arnette blackwell (Ed)* 1995. ISBN 2-7184-0664-x.
- Williams DE, Eisenman J, Baird A, Rauch C, Van Ness K, March CJ, Park LS, Martin U, Mochizuki DY, Boswell HS, Burgess GS, Cosman D, Lyman SD.** Identification of a ligand for the c-kit proto-oncogen. *Cell* 1990 ; cité dans Nicos A. Nicola (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press. ISBN 0-19-859947-1.
- Williams RH.** « Textbook of Endocrinology » 1994. Wilson JD, Foster DW (Eds), W.B. Saunders Company. ISBN 0-7216-9514-0.
- Winger QA, de los Rios P, Han VKM, Armstrong DT, Hill DJ, Watson AJ.** Bovine oviductal and embryonic insulin-like growth factor-binding proteins : possible regulator of « embryotrophic » insulin-like growth factor circuits. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 1415-1423.
- Woad KJ, Armstrong DG, Baxter G, Hogg CO, Bramley TA, Web R.** Expression of insulin-like growth factor-binding protein-2, -3 and -4 mRNA in the bovine corpus luteum. *J Reprod Fertil* 1997 ; 20 : 16.
- Wuu Y-D, Pampfer S, Vanderheyden I, Lee K-H, De Herthog R.** Impact of tumor necrosis factor α on mouse embryonic stem cells. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 1416-1424.

- Wuu Y-D, Pampfer S, Becquet P, Vanderheyden I, Lee K-H, De Hertog R.** Tumor necrosis factor α decreases the viability of mouse blastocysts in vitro and in vivo. *Biol Reprod* 1999 ; 60 : 479-483.
- Xiao CW, Murphy BD, Sirois J, Goff AK.** Down-regulation of oxytocin-induced cyclooxygenase-2 and prostaglandin F synthase expression by interferon-tau in bovine endometrial cells. *Biol Reprod* 1999 ; 60 : 656-663.
- Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM.** Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 1991 ; cité dans Nicos A. Nicola (Ed), « Guidebook to cytokines and their receptors » 1997, Oxford University Press. ISBN 0-19-859947-1.
- Yoshimura Y, Ando M, Nagamatsu S, Iwashita M, Adachi T, Sueoka K, Miyazaki T, Kuji N, Tanaka M.** Effects of insulin-like growth factor I on follicle growth, oocyte maturation, and ovarian steroidogenesis and plasminogen activator activity in the rabbit. *Biol Reprod* 1996 ; 55 : 152-160.
- Yuan W, Bao B, Garverick HA, Youngquist RS, Lucy MC.** Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. *Dom An Endocrinol* 1998 ; 15(1) : 55-63.
- Zhao Y, Rong H, Chegini N.** Expression and selective cellular localization of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and GM-CSF α and β receptor messenger ribonucleic acid and protein in human ovarian tissue. *Biol Reprod* 1995 ; 53 : 923-930.
- Zhao Y, Burbach JA, Roby KF, Terranova PF, Brannian JD.** Macrophages are the major source of tumor necrosis factor α in the porcine corpus luteum. *Biol Reprod* 1998 ; 59 : 1385-1391.
- Zhaoping G, Whitney CN, Char EF, John EG.** Protein concentration of IGF-I, IGFBPs 2-5 and IGF-type I receptor (IGF-IR) in porcine corpora lutea. *Biol Reprod* 1998 ; 58 : 218.
- Zheng J, Bird IM, Magness RR.** Basic fibroblast growth factor (bFGF) and epidermal growth factor (EGF) elevate mRNA levels of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in ovine feto-placental artery endothelial cells. *Biol Reprod* 1997 ; 56 : 148.

Annexes

facteur a
facteur b

facteurs de croissance
présence/absence FF

	M	M + IGF	M + EGF	M + TNF
sans FF	0	80	60	60
	10	80	100	70
	0	60	60	50
	10	60	40	70
	0	80	60	73,333
	0	60	60	40
	0	80	60	80
	0	70	70	40
	10	80	70	60
	60	50	70	80
avec FF	70	70	80	80
	80	60	60	60
	40	70	70	50
	93,333	73,333	86,67	73,333
	70	100	90	60
	80	70	100	90
	70	80	70	80
	80	60	60	70

4410,002

Moyennes

	M	M + IGF	M + EGF	M + TNF	Moy. Lignes	
sans FF	3,333	72,222	64,444	60,370	50,093	
avec FF	71,481	70,370	76,297	71,481	72,407	
Moy. Colonnes	37,407	71,296	70,371	65,926	61,250	Moy gén

Variances

	M	M + IGF	M + EGF	M + TNF		
sans FF	25,000	94,444	252,778	209,567		
avec FF	228,085	201,234	190,132	161,420		
					170,332	CMR

Hartley

H obs	10,1	
H 95%, 8, 8	10,5	A H0
H 99%, 8, 8	16,9	A H0

Anova 2

croisée fixe

Source	SCE	DL	CM	F observé	F table 95%	F table 99%	
T	46943,18	71					
F	36041,90	7	5148,84317	30,2281975	2,17	2,95	R H0
A	13940,03	3	4646,67763	27,2800481	2,76	4,13	R H0
B	8963,18	1	8963,17679	52,6216607	4	7,08	R H0
AB	13138,69	3	4379,56416	25,7118591	2,76	4,13	R H0
R	10901,28	64	170,332458	1			

On peut déjà dire qu'il existe un effet des deux critères, à savoir :

critère a facteurs de croissance

critère b présence/absence de FF

Ainsi qu'une interaction entre ces deux critères

Moyennes

	M	M + IGF	M + EGF	M + TNF
sans FF	3,333	72,222	64,444	60,370
avec FF	71,481	70,370	76,297	71,481

Contrastes de Scheffé :

PPDS 95%	15,6975886
PPDS 99%	18,3026546

RH0

Sans FF					
	M	M + IGF	M + EGF	M + TNF	
sans FF	3,333	72,222	64,444	60,370	
M	3,333	0			
M + IGF	72,222	68,89	0		
M + EGF	64,444	61,11	7,78	0	
M + TNF	60,370	57,04	11,85	4,074	0

avec FF					
	M	M + IGF	M + EGF	M + TNF	
avec FF	71,481	70,370	76,297	71,481	
M	71,481	0			
M + IGF	70,370	1,11	0		
M + EGF	76,297	4,82	5,93	0	
M + TNF	71,481	0	1,11	4,81522222	0

Contrastes orthogonaux :

avec FF						
M	M + IGF	M + EGF	M + TNF	somme(ciTi)	somme ci^2	D^2
30,000	650,000	580,000	543,333			
3	-1	-1	-1	-1683,333	12	26237,1295
0	2	-1	-1	176,667	6	577,98572
0	0	1	-1	36,667	2	74,6927161

Fobs	F 1; dIR, 95%	F 1; dIR, 99%	
154,03482			RH0
3,39327999	4,00	7,08	AH0
0,43851135			AH0

sans FF						
M	M + IGF	M + EGF	M + TNF	somme(ciTi)	somme ci^2	D^2
643,333	633,333	686,670	643,333			
3	-1	-1	-1	-33,337	12	10,2903293
0	2	-1	-1	-63,337	6	74,2884365
0	0	1	-1	43,337	2	104,338643

Fobs	F 1; dIR, 95%	F 1; dIR, 99%	
0,0604132			AH0
0,43613788	4,00	7,08	AH0
0,61255878			AH0